

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

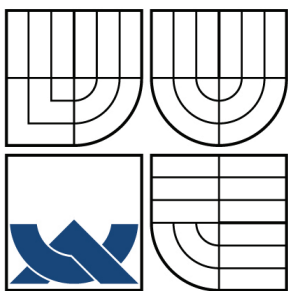
HYDRATACE BIOMOLEKUL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

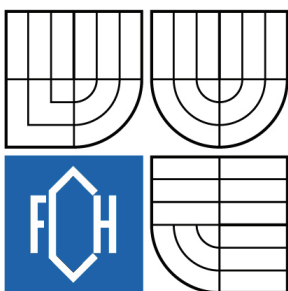
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KAROL FLIMEL

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDRATACE BIOMOLEKUL

HYDRATION OF BIOMOLECULES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

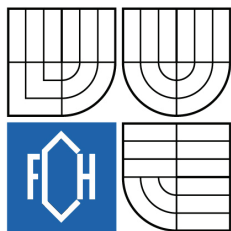
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KAROL FLIMEL

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. JIŘÍ KUČERÍK, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0254/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Karol Flimel	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí bakalářské práce:	Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Hydratace biomolekul

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma hydratace, struktura vody a termická analýza
2. Zvládnutí technik DSC a TGA
3. Provedení vlastních experimentů.
4. Vyhodnocení experimentálních dat

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Karol Flimel
Student(ka)

Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo využitie metód termickej analýzy (diferenčná kompenzačná kalorimetria a termogravimetria) pri štúdiu kinetiky odparovania vody z hyaluronanu. Tento prístup pomohol k stanoveniu zmien desorbčných energií v priebehu odparovania a pomohol tak k lepšiemu pochopeniu hydratácie hyaluronanu. S využitím oboch termoanalytických techník a s pomocou bezmodelovej kinetiky navrhnutého prof. Ozawom boli stanovené kinetické parametre študovaných procesov. Výsledky potvrdili predchádzajúce poznatky týkajúce sa množstva vody naviazanej v primárnej hydratačnej obálke hyaluronanu, t.j. množstvo tejto vody sa pohybuje v oblasti koncentrácií 0,4-0,8 g vody na 1 g hyaluronanu.. Ďalej bolo zistené, že v priebehu odparovania vody dochádza pri týchto koncentráciách k tvorbe hyaluronového gélu stabilizovaného pravdepodobne vodíkovými mostíkmi.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to apply methods of thermal analysis (differential scanning calorimetry and termogravimetry) to study kinetics of water evaporation from hyaluronan. This approach allowed to determine the changes of desorption energies in the course of evaporation and consequently helped to improve the understanding of the hyaluronan hydration. Thermoanalytical methods in combination with model-free kinetics previously suggested by Ozawa were used to determine kinetic parameters of studied processes. Results confirmed previous knowledge about the content of water located in primary hydration shell of hyaluronan, i.e. concentration range from 0.4 – 0.8 g of water per 1 g of hyaluronan. Further, it was found out that during the evaporation in this concentration range, the hyaluronan gel, stabilized probably by hydrogen bonds, is formed.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Hydratácia, biomolekula, termická analýza

KEYWORDS

Hydratation, biomelecule, thermalanalysis

FLIMEL, K. *Hydratace biomolekul*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a sám citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využívaná ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Rád by som poďakoval svojmu vedúcemu, pánovi Ing. Jiřímu Kučeríkovi, PhD za výborné vedenie, jasnú myšlienku tejto práce a za jeho pomoc, energiu a ochotu, ďalej slečne Ing. Alene Průšovej za pomoc a ochotu pri získavaní výsledkov z meraní. Taktiež chcem poďakovať za hodnotné rady pánovi Ing. Jiřímu Kislingerovi a všetkým, ktorí to so mnou odtrpeli pri jej tvorbe. Veľké ĎAKUJEM.

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	História	8
2.1.2	Výskyt, použitie a produkcia.....	8
2.1.3	Štruktúra	9
2.2	Voda.....	10
2.2.1	Vlastnosti.....	10
2.2.2	Hydratácia	11
2.2.2.1	Štruktúra vody	11
2.2.2.2	Hydratácia biomolekúl	12
2.2.2.3	Efekty pre vodu viazanú na štruktúru polysacharidu a jej štruktúru	13
2.2.2.4	Triedenie typu vody v hydratačnej vrstve	13
2.3	Termálna analýza	13
2.3.1	Úvod	13
2.3.2	Charakteristika	14
2.3.3	Princíp TA a jej fungovanie	14
2.3.4	Termogravimetria (TG).....	15
2.3.5	Diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC)	16
2.3.5.1	Úvod do DSC	16
2.3.5.2	Princíp DSC	16
2.3.5.3	DSC s tepelným tokom.....	17
2.3.5.4	DSC s kompenzáciou výkonu	17
2.3.5.5	Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria (TMDSC).....	17
2.3.6	Termická analýza pri štúdiu biopolymérov a jej využitie v praxi.....	18
2.3.6.1	Diferenčná kompenzačná kalorimetria	18
2.3.6.2	Termogravimetria.....	19
2.3.7	Reakčná kinetika	19
2.3.8	Jednokroková aproximácia.....	19
2.3.9	Izokonverzné metódy	20
2.3.9.1	Izotermické izokonverzné metódy	21
2.3.9.2	Izokonverzné metódy pri lineárnom zahrievaní	22
3	CIEĽ PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
4.1	Príprava vzoriek HYA/voda.....	25
4.2	Termická analýza vzoriek	25
4.2.1	DSC	25
4.2.2	TG.....	26
4.2.3	Kinetika	26
5	VÝSLEDKY	27
6	DISKUSIA.....	34

7	ZÁVER.....	37
8	SLOVNÍČEK POJMOV A SKRATIEK.....	38
9	ZOZNAM ZDROJOV	39

1 ÚVOD

Posledné kroky modernej vedy smerujú k hľadaniu látok telu vlastným na transport liečiv, či špecifických zlúčenín na potrebné miesto v tele a ľahko odbúrateľným po splnení ich primárnej funkcie bez zanechania vedľajšieho efektu. Najčastejšie sa javia za výhodné rôzne polysacharidy ako hyaluronan, ktoré sú telu vlastné a produkované nižšími organizmami ako sú baktérie či kvasinky.

Hyaluronan je polysacharid telu vlastný, nachádza sa v rôznych častiach hlavne v sklovci oka, pokožke či ako výplň maziva kĺbov. Je silne hydrofilný a schopný viazať látky, čím sa považuje za dobrý prenášač a má široké použitie v medicíne a vo farmácii či v kozmetike na liečenie ťažko liečiteľných rán v spojení s jódom, na hydratáciu pokožky v podobe sodnej alebo draselnej soli.

Hyaluronan predstavuje jednu z najdôležitejších v medicíne využívaných látok majúcich vysokú retenčnú kapacitu vody. I keď bola táto vlastnosť mnoho krát skúmaná, stále ešte existuje niekoľko nejasností týkajúcich sa tejto problematiky.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

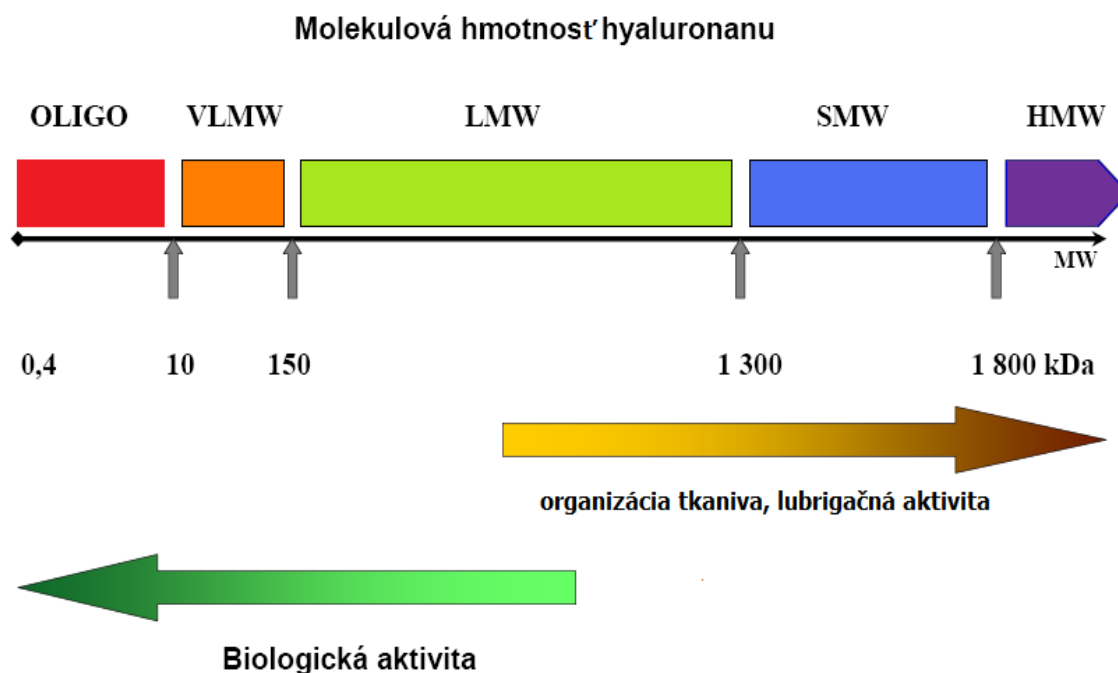
2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 História

Názov kyseliny hyaluronovej pochádza zo slova hyalos (grécky pre sklovec). Urónová kyselina bola prvý krát izolovaná zo sklovca hovädzieho dobytku Karlom Meyerom v roku 1934, kde sklovec obsahoval aj veľké množstvo urónovej kyseliny [1].

2.1.2 Výskyt, použitie a produkcia

















Kyselina hyalurónová je prirodzene sa vyskytujúci polysacharid u cicavcov a niektorých mikroorganizmov. In vivo sa nevyskytuje v kyslej protonizovanej forme, ale vo forme svojej sodnej soli tzv. hyaluronan (HYA). Tento biopolymér zastáva dôležité biologické funkcie v organizme, ktoré závisia na molekulovej hmotnosti, kde pre molekulovú hmotnosť od 0,4 po 900 kDa, ktorá zabezpečuje biologickú aktivitu, kdežto od 900 do 1800 kDa sa podieľa na organizácii tkanív a lubrigačných aktivitách [2] ako zobrazuje obr.1. HYA sa u cicavcov nachádza v celom organizme, vo väčšej miere sa vyskytuje v mäkkých spojivových tkanivách taktiež v pokožke, sklovci oka alebo pupočnej šnúre [3]. Napríklad pri poranení kože dramaticky vzrastie množstvo HYA v oblasti poranenia, čo indikuje zápal, ďalej niektoré molekulové hmotnosti HYA môžu poukazovať na výskyt tumoru a zároveň súvisieť so zhubnosťou daného tumoru. Telo 70 kg človeka obsahuje cca. 15 g HYA, kde 5 g denne podlieha metabolickej premene. HYA je tiež produkováný niektorými baktériami ako extracelulárna ochranná kapsula [4].



Obrázok č.1 závislosť funkcie HYA na molekulovej hmotnosti[4].

Použitie HYA má široký rozsah. Používa sa v medicíne napríklad ako lubrigačné činidlo pre intraartikulárnu aplikáciu. Keďže je HYA dobrý humektant používa sa v kombinácii s dezinfekčnými činidlami ku hojeniu rán kde sa degraduje na oligosacharidy s regulačnou funkciou. Možno využitie HYA je aj pri cielenej distribúcii liečiv. HYA je tiež možné využiť pre tkanivové inžinierstvo ako scaffold.

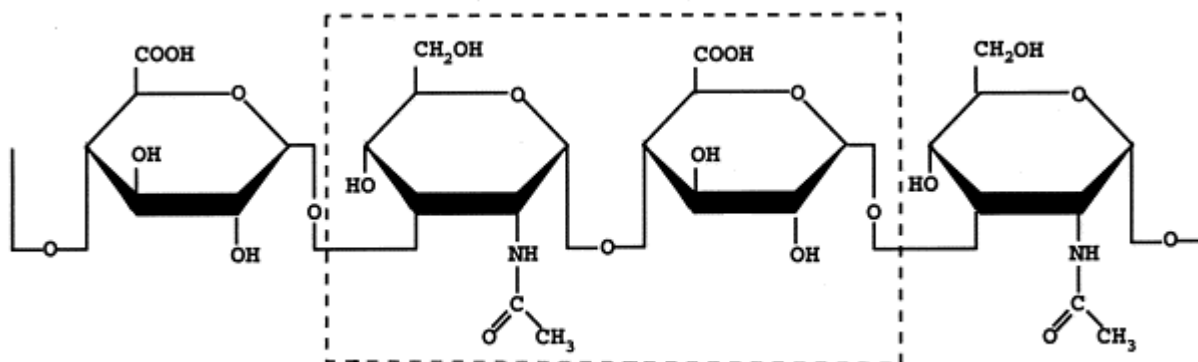
Komerčne bol HYA z počiatku extrahovaný zo živočíšnych tkanív napríklad z kohútích hrebienkov alebo zo sklovca oka hovädzieho dobytku, všeobecne z tkanív bohatých na hyaluronan, ale od tejto metódy sa dnes odstupuje z etických dôvodov a možnosti zanesenia vírovej infekcie, preto sú v dnešnej dobe tieto metódy nahradzované fermentačnou produkciou kmeňmi baktérií *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Bacillus subtilis*, ktoré môžu byť geneticky modifikované (GMO) atď. (obr. 3) [5].

Hyaluronan z kohútích hrebienkov		Hyaluronan z <i>Bacillus subtilis</i>		Hyaluronan z <i>Streptococcus equi</i>	
živočíšný zdroj		biotechnologický zdroj		biotechnologický zdroj	
non-GMO		GMO		non-GMO	
vysoký obsah nečistot		nízky obsah nečistot		nízky obsah nečistot	
molekulová hmotnosť > 4 MDa		molekulová hmotnosť < 1 MDa		molekulová hmotnosť až 3 MDa	
				široká škála molekulových hmotností	

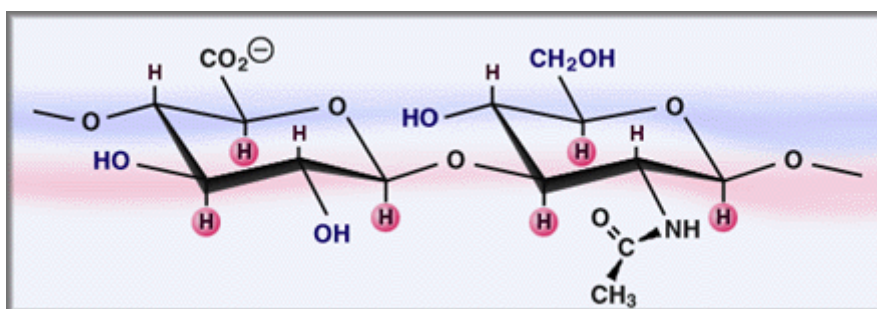
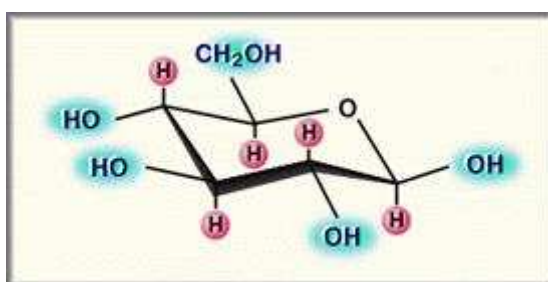
Obrázok č.2 spôsoby extrakcie HYA a jej výhody a nevýhody [5].

2.1.3 Štruktúra

Hyaluronan je lineárny, nerozvetvený, vysoko molekulový, polárny polysacharid patriaci do triedy glykosaminoglykanov. Je zložený z dvoch pod jednotiek a to N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukurónovej kyseliny viazaných β 1–4 glykozidickou väzbou a tieto disacharidické jednotky sú viazané β 1–3 glykozidickou väzbou (obr. 3) [6]. Obe sacharidické jednotky sú priestorovo príbuzné glukóze, čo v β konfigurácii povoľuje veľkým skupinám (hydroxylová, polokarboxylová a anomernému uhlíku na ďalšom cukre) držať sféricky výhodnú ekvatoriálnu konformáciu pokým všetky malé atómy vodíka obsadzujú menej stéricky výhodnú axiálnu konformáciu, ktorú môžeme vidieť na obrázku č. 4-5



obrázok č.3 štruktúrny vzorec disacharidickej jednotky HYA [6].



obrázok č.4-5 sférické usporiadanie skupín a vodíkov na polyreťazci [7].

V sekundárnej štruktúre sa jednotlivé disacharidové jednotky točia okolo osi do 180° závitnice a tvoria reťazec. Dve závitnice (360°) prinášajú späť pôvodnú orientáciu z tohto dôvodu je štruktúra v podobe dvojitého alfahelixu [7].

2.2 Voda

2.2.1 Vlastnosti

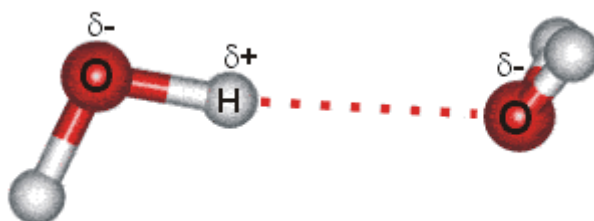
Voda je najjednoduchšia zlúčenina dvoch najviac sa vyskytujúcich prvkov v prírode a to kyslíku a dvoch vodíkov spojených polárnou väzbou, jej úloha je nezastupiteľná pre život. Samotná má v organizme množstvo úloh ako rozpúšťadlo, zabezpečuje stálosť vnútorného prostredia, separačné činidlo, distribútor živín a transport metabolitov, reagujúca zložka v mnohých reakciách, regulátor teploty, mazadlo, transportné médium nevyhnutných

štrukturálnych pochodov v molekulách bielkovín alebo nukleových kyselín, ďalej ako tlmič nárazov napríklad v mozgu [8].

2.2.2 Hydratácia

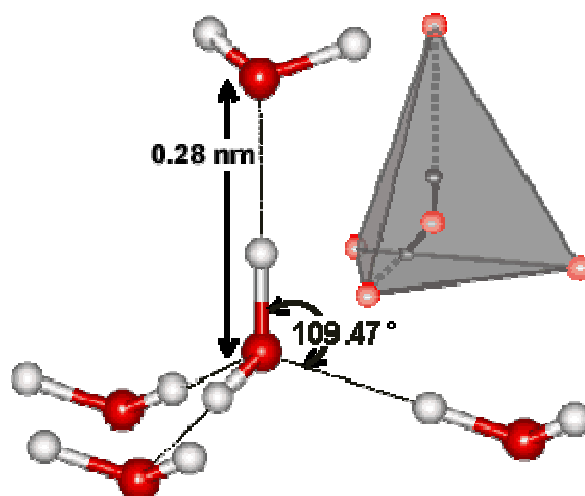
2.2.2.1 Štruktúra vody

Hydratácia molekúl vyplýva zo štruktúry vody a jej chovaním sa v roztoku. V molekule vody jadra kyslíka s ôsmymi kladne nabitými časticami priťahujú elektróny lepšie ako atómy vodíka s jeho jednou kladne nabitou časticou. Z toho dôvodu má kyslík parciálny záporný náboj a vodík parciálny kladný, a preto sú tu prítomné, mimo kovalentných väzieb, slabé interakcie medzi kyslíkom a vodíkom inej molekuly vody tzv. vodíkové mostíky [9] (obrázok č.6).



Obrázok č.6 Znážornenie vodíkového mostíka medzi dvomi molekulami vody [9].

Vodíková väzba vo vode je veľmi slabá, ako som už spomenul, jej sila je len jedna dvadsatina kovalentnej sily medzi O...H, kde príťažlivosť väzbových elektrónov tohto páru O...H smerom k atómu kyslíka zanecháva deficit na vzdialenej strane vodíkového atómu vzhľadom na ďalší atóm kyslíka. Výsledkom je, že najsilnejšia väzba medzi vodíkom z kovalentnej väzby O...H a susedným kyslíkom nastáva vtedy, keď sú všetky usporiadané lineárne, čiže O...H–O a vzdialenosť atómov kyslíka je do 0,28 nm. Každá molekula vody môže tvoriť štyri vodíkové väzby a to dve vlastné umocnené ich vodíkovými atómami a dve využívajúce vodíkové atómy pripojené na susedné molekuly vody, ktoré sa prirodzene usporiadávajú do formácie tetraedra demonštrovaný na obrázku č.7 [10].



Obrázok č.7 Formácia tetraedra piatich molekúl vody a jeho priestorové usporiadanie [10].

2.2.2.2 Hydratácia biomolekúl

Jedna z možností delenia vody pri hydratacii biomolekúl na základe fyzikálnych vlastností je na základe ich rozdielnych entalpií a teplôt topenia, t.j. existujú tri základne typy a to viazaná mrznúca, viazaná nemrznúca a voľná mrznúca, ktorá býva zabudovaná v štruktúre alebo aj mimo nej. Tieto formy vody sú základným predpokladom pre správne pochopenie hydratacie ako takej. Termín viazanej vody je veľmi ťažké porozumieť a ešte obtiažnejšie presne definovať. Neviazaná voda mrzne ako normálna voda pri 0°C a táto teplota je závislá na rýchlosti chladenia a entalpia topenia je 334 J/g-18,56 J/mol. Voda viazaná mrznúca kryštalizuje a topí sa pri nižších teplotách než voda neviazaná a je tu redukcia aj v hodnote entalpie topenia. Viazaná nemrznúca voda sama o sebe nemrzne. K stanoveniu vyššie spomenutých typov vody môžeme využiť metódu diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (DSC). [11, 12, 13]

Vodíková väzba je oslabovaná ak jeden z darcov vodíkových väzieb vody má silnejší základ ako voda samotná. Napríklad karboxyláty zapríčiňujú oslabovanie vodíkových väzieb v ďalšej hydratačnej obálke a tým vzniká narušovanie siete vodíkových väzieb. V blízkosti elektrolytu je osmotická aktivita vysoká a chemický potenciál a aktivita vody nízka. Potenciál vody je čiastočne zvyšovaný narušovaním siete vodíkových väzieb. Ak je povrch vysoko nabitý, zóna vody s vysokou hustotou (HDW - high density water) môže dosiahnuť až niekoľko nanometrov, čo zapríčiňuje, že hustota hydratačnej vrstvy môže byť vyššia než 1.1 g.cm⁻³. Zóna obsahuje slabé vodíkové väzby, je reaktívna, kumuluje malé katióny, obsahuje viacmocné anióny alebo hydrofóbne prísady. Pre udržanie stáleho potenciálu vody, kde voda obklopujúca zónu HDW s nízkym potenciálom je znižovaný k tomu, aby bola vyrovnaná produkcia zón s nízkou hustotou vody (LDW – low density water), ktorá je dosť rozsiahla pokiaľ sa jedná o znižovanie celkovej hustoty v strede. Tieto dve zóny HDW a LDW môžu byť rozlíšené neostro alebo perfektne sformované, ale konečný chemický potenciál bude rovnaký [14].

Tuhosť polysacharidového reťazca je závislý na vzdialenosti opačných iónov (v prípade, že je krátka to vedie k zvyšovaniu medzimolekulovej príťažlivosti, kdežto pri veľkej vzdialenosti nastáva prípad LDW). Pravidlá pre tvorbu iónových párov môžu byť sledované na slabo hydratovaných karboxylových skupinách, kde silne hydratované ióny (Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) budú absorbované do iónových povrchov menej ako slabo hydratované ióny (C⁺, K⁺, Na⁺) [15, 16, 17].

Niektoré polyelektrolytické polysacharidy (napr. pektíny obsahujúce viac ako 57% nemetylovaných karboxylátov) môžu formovať spojovacie zóny cez dvojmocné katióny ako napríklad Ca²⁺ pokiaľ spolupracuje minimum zo zvyškového množstva. Napríklad dve karboxylové skupiny napomáhajú k odpudzovaniu viazanej vody preč od Ca²⁺ iónov za formovania spojovacích zón ich solí. Nízky potenciál vody s pridruženými iónovými pármami je ovplyvňovaný blízkou okolitou vodou, ktorá vyrovnáva ich potenciály. Toto núti okolitú vodu, ktorá má nižšiu hustotu, k väčšiemu rozširovaniu [18].

2.2.2.3 Efekty pre vodu viazanú na štruktúru polysacharidu a jej štruktúru

- Silne viazaná voda a hydrofóbny povrch sú spojené s tvorbou spojovacích zón
- Tvorba spojovacích zón zapríčiňuje tvorbu úsekov, kde tvorba vodných klastrov redukuje odtok vody; klastre 20-30 molekúl majú problémy prejsť cez póry.
- zmeny medzi jednoduchými a dvojitými vodíkovými väzbami vo vode môžu zapríčiniť časové premenné zmeny štruktúry,
- hydrofóbne povrchy sú čiastočne separované ak sú v blízkosti nabitých skupín – HDW (high density water – viazaná voda s vysokou hustotou) generuje LDW (low density water bound – viazaná voda s nízkou hustotou). LDW generovaná blízko hydrofóbneho povrchu nie je silná sama od seba aby tvorila spojovací zóny, musí byť podporená „externí“ LDW za použitia HDW dvojvrstvy alebo silnými H-mostíkmi,
- veľké množstvo vody je zadržované v blízkosti spojovacích zón (tzv. mrznúca viazaná) a toto množstvo vzrastá s rozsahom spojovacích zón [19],
- voda čiastočne viazaná štruktúrou polysacharidu (napríklad po ose gyračného polomeru) má obmedzenú difúziu, pretože sa môže pohybovať iba v jednom smere.
- ak je v štruktúre prítomná LDW vo väčšom množstve zníži sa vlastná difúzivita zatiaľ čo viskozita sa bude zvyšovať,
- hydratované polyméry sú skoro nepriepustné ďalším polymérom vďaka štruktúre hydratacie; ak sú ich hydratačné vlastnosti podobné môžu sa tvoriť rôzne spojovací zóny kombináciou hydratačných vrstiev. Pokiaľ ku kombinácii nedôjde, môže dôjsť k fázovej separácii,
- nepolárne molekuly zvyšujú štrukturálnu organizáciu vody cez hydrofóbnú hydrataciu.

2.2.2.4 Triedenie typu vody v hydratačnej vrstve

- hustá silne viazaná voda spojená s neorientovanými silnými H-viazanými skupinami a nabitými skupinami vrátane ich opačne nabitých iónov,
- slabo viazaná voda o nízkej hustote spojená s hustou vodou,
- slabo viazaná voda o nízkej hustote spojená s orientovanými H-viazanými skupinami,
- slabo viazaná voda o nízkej hustote spojená s hydrofóbnymi skupinami,
- zmiešaná neviazaná rozštruktúrovaná voda (dôsledok hydratačných efektov) [18].

2.3 Termálna analýza

2.3.1 Úvod

Termická analýza (TA) je definovaná ako skupina techník, v ktorých vlastnosti vzorku sú sledované v závislosti na čase alebo teplote, kde táto teplota je na programovanou teplotou vzorku v špecifikovanej atmosfére. Preto teplotný program môže zahŕňať ohrev alebo chladenie pri konštantnej teplote či za zmeny teploty. Je ale možné ich aj kombinovať v jednom viac krokovom deji. Základom je poznatok, že vzorka je meraná za nerovnovážnych podmienok, tým pádom pozorovaná teplota prechodu nie je v skutočnosti rovnovážnou teplotou prechodu. TA je široko uplatniteľná v priemyselných a vedeckých odvetviach [20]

Schopnosť týchto techník kvalitatívne a kvantitatívne charakterizovať v obrovskom rozsahu rôznorodosť materiálu bol rozhodujúci v prijatí tejto metódy ako analytickú. Operačná jednoduchosť a rýchlosť získavania výsledkov znamená, že ju veda začala využívať vo zvýšenom množstve aplikácii [21].

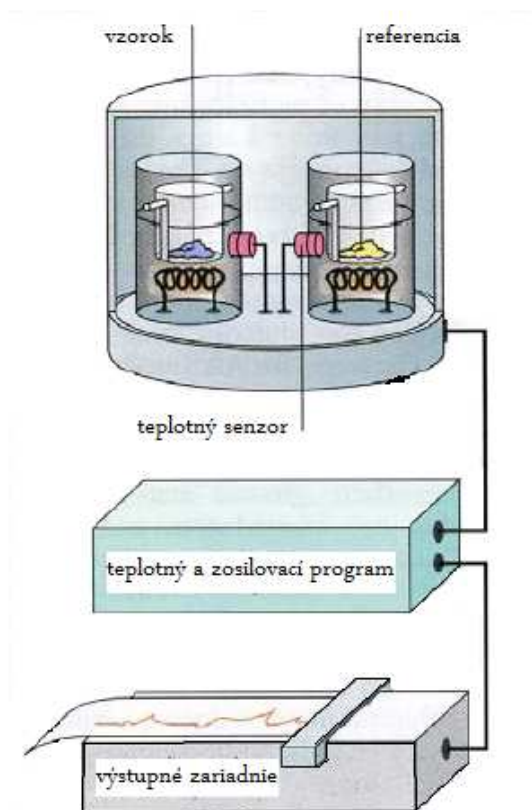
2.3.2 Charakteristika

Súhrn výhod TA ako analytickej metódy.

- vzorka môže byť študovaná v širokom rozsahu teplôt pomocou rôznych teplotných programov,
- Takmer každá forma vzorky môže (pevná, kvapalná a gél) byť prispôbená k používaným vzorovým matriciam či prílohám,
- Používa sa malé množstvo vzorky (cca 0.1–50 mg),
- Atmosféra v okolí vzorky môže byť štandardizovaná,
- Čas požadovaný na dokončenie experimentu sa pohybuje v rozmedzí niekoľkých minút až hodín (záleží na zvolenej rýchlosti experimentu).
- Cena TA zariadení je relatívne prijateľná v závislosti na rozsahu využitia [21].

Namerané výsledky z TA sú nepriame a bývajú pre korekciu porovnané s inou metódou napr. NMR, ktoré môžu ozrejmiť molekulové procesy a ich chovanie. Získané výsledky sú ovplyvnené experimentálnymi parametrami ako veľkosť vzorky, rýchlosť ohrievania a ochladzovania, povaha a zloženie okolitej atmosféry, tepelnou a mechanickou históriou vzorky [21].

2.3.3 Princíp TA a jej fungovanie



Obrázok č. 8 schematické znázornenie fungovania TA zariadenia [21].

Obrázok č. 8 schématicky znázorňuje TA zariadenie a jeho časti. Aparát je zostavený z cely so vzorkou a porovnávacou referenciou, teplotného senzoru a ochrannej atmosféry v cele. Ďalej je to teplotný program a zosilňovacie zariadenie vyúsťujúce do výstupného zariadenia. Moderné prístroje sú vždy plošne pripojené k počítaču (pracovnej stanici), ktorý kontroluje operácie v zariadení ako rozsah teplôt, rýchlosť ohrievania a chladnutia, tok inertného plynu, vytváranie atmosféry, zhromažďovanie dát a ich uchovávanie [21].

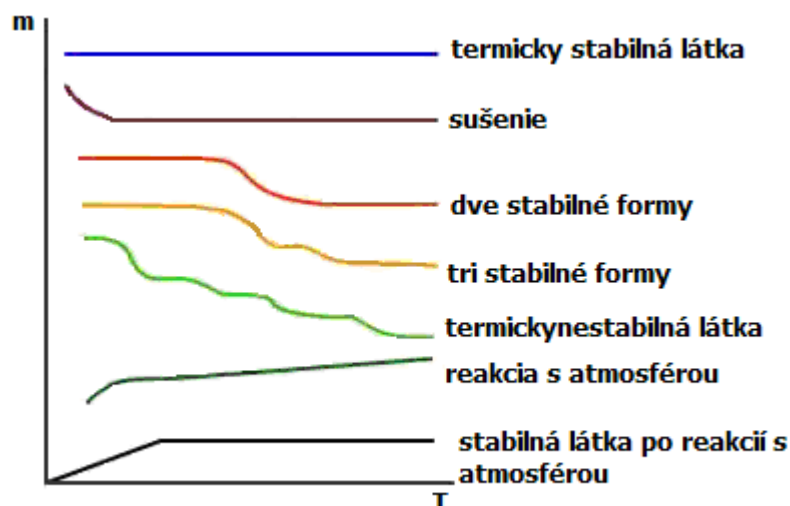
Prehľad niektorých metód:

Meraná veličina	Názov metódy	Skratka metódy
Hmotnosť	Termogravimetria	TG
Rozdiel teploty	Diferenčná termická analýza	DTA
Striedanie teploty	Striedavá prúdová kalorimetria	ACC
Entalpia	Diferenčná kompenzačná kalorimetria	DSC
Dĺžka, objem	Dilatometria	
Deformácia	Termomechanická analýza	TMA
	Dynamicko-mechanická analýza	DMA
Elektrický prúd	Termostabilná prúdová analýza	TSC

2.3.4 Termogravimetria (TG)

Termogravimetria (TG) je odbor TA, ktorý skúma hmotnostný úbytok vzorky v závislosti na teplote alebo ako funkciu času pri izotermických dejoch, nemôžeme k nej radiť všetky tepelne deje spôsobujúce zmenu hmotnosti ako napríklad (tavenie, kryštalizáciu, sklený prechod...) musia v nich byť zahrnuté deje významné pre termálnu analýzu ako napríklad (sublimácia, desorpcia, redukcia, oxidácia, vyparovanie, vstrebávanie...). Metóda je využívaná na charakterizáciu tepelnej stability rôznych materiálov za rozličných podmienok a skúmanie kinetiky fyzikálno-chemických procesov nastávajúcich vo vzorke. Hmotnostné úbytky určitého materiálu sú silne závislé na experimentálnych podmienkach. Faktory ako hmotnosť vzorky, objem, fyzikálna forma, tlak atmosféry vo vzorkovej komore a rýchlosť snímania majú silný vplyv na charakteristickom znázornení TG krivky. Krivky záznamu z TG sú znázorňované ako graf zmeny hmotnosti (m) (osa X) v závislosti na teplote (osa Y) (°C) alebo čase (t) pri izotermickom deji (obr. 9) [21].

Najčastejšie využitie TG je pri určovaní tepelnej stability látky, výparnosti a pri štúdiu kinetiky procesov dejúcich sa pri jej zmene. Kombinácia metód napríklad TG a DTA môže poskytnúť omnoho komplexnejší pohľad na študované procesy a javy [22].



Obrázok č. 9 znázornenie základných charakteristických kriviek TG, vykreslenie je len schématicke, v reálne môžu mať aj iný tvar [21].

2.3.5 Diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC)

2.3.5.1 Úvod do DSC

Prvý komerčný DSC prístroj bol predstavený v roku 1964 pánmi Watsonom a Perkinom, ktorí ako prví použili meno odlišujúce skenovacíu kalorimetriu [23]. Ich prístroj výkonovo kompenzuje a udržuje nulový rozdiel medzi vzorkou a referenciou nahradzujúcou elektrickú energiu (z tohto dôvodu výkonová kompenzácia) buď do vzorky alebo do referencie v závislosti na tom či vzorka bola ohrievaná alebo chladená v lineárnom pomere. Množstvo tepla potrebného na udržanie izotermickej teploty vzorky a referencie je potom znázorňovaná ako funkcia teploty [20].

2.3.5.2 Princíp DSC

Diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC) patrí do skupiny termoanalytických metód, v ktorých sú vlastnosti vzorky sledované v závislosti na čase alebo teplote v naprogramovanej alebo zvolenej špecifickej atmosfére. Program môže zahŕňať zohrievanie alebo ochladzovanie v pevnej alebo premennej zmeny teploty či držanie stálej teploty (izotermický dej) alebo spojením oboch metód. Základnou myšlienkou DSC je rovnováha a nerovnováha kinetiky a termodynamiky [20]. Merania poskytujú kvalitatívne a kvantitatívne informácie o fyzikálnych a chemických zmenách, ktoré zahŕňujú endotermické procesy ako teplo vtekajúce do vzorky alebo exotermické procesy prúdenia tepla von zo vzorky či meranie tepelnej kapacity pri vzniku skleného prechodu [24].

Podstata merania tepelného rozdielu medzi vzorkou a referenciou je funkciou času, ale od doby ako sa teplota začína meniť lineárne je to funkcia teploty. Tepelný tok je v skutočnosti odvodený z kombinácie vzťahov $\Delta T(t)$ a $d\Delta T(t)/dt$ [25]. Oba z nich sú transparentné k užívateľovi od tej doby, čo elektronika je schopná priamo vynášať hodnotu tepelného toku z týchto podmienok [24].

2.3.5.3 DSC s tepelným tokom

Pri DSC s tepelným tokom sa meria teplotný rozdiel medzi vzorkou a jej referenciou ako funkcia teploty či času za regulovaných teplotných podmienok. Teplotný rozdiel je úmerný zmene v tepelnom toku (príkone za jednotku času).

Princíp merania je v tom, že termočlánky sú pripojené k spodku držiaku vzorky a jeho referencie. Druhá séria termočlánkov meria teplotu pece a termosenzitívnej doštičky. Behom danej fázovej premeny je teplo absorbované alebo emitované vzorkou vyjadrené zmenou tepelného toku cez termosenzitívnu doštičku. Zmena tepelného toku spôsobí nárast teplotného rozdielu meraného medzi pecou a termosenzitívnou doštičkou. Tepelná kapacita tejto doštičky je meraná ako funkcia teploty adiabatickou kalorimetriou behom procesu výroby, poskytujúca odhad entalpie prechodu, danou narastajúcimi teplotnými výkyvmi [26].

2.3.5.4 DSC s kompenzáciou výkonu

Pri DSC s kompenzáciou výkonu sa udržiava nulový teplotný rozdiel medzi vzorkou a referenciou dodávaním elektrického prúdu (odtiaľ názov kompenzácia výkonu) buď vzorku alebo referenciu. Závisí na tom, či vzorka bola ohrievaná alebo chladená lineárnou rýchlosťou. Okrem toho, že pri tomto DSC s kompenzáciou výkonu je endotermický prechod, ktorý odpovedá nárastu entalpie, indikovaný ako pík smerujúci smerom nahor (preto lebo je výkon vzorku dodávaný), zatiaľ čo exotermický prechod, pokles entalpie, je ukázaný ako pík smerujúci nadol.

Tepelná energia potrebná k udržaniu izotermických podmienok medzi vzorkou a referenciou je zaznamenávaná ako funkcia času (za použitia izotermického teplotného programu) alebo teploty v prípade lineárneho či nelineárneho ohrevu alebo chladenia ale aj ich rôznou kombináciou [24].

Pri tomto type DCS sú držiaky vzorky a referencie samostatne pripojené k odporovým senzorom, ktoré merajú teplotu držiaku na spodnej strane a odporovým ohrievačom, ktorý je menší ako u DSC s tepelným tokom a tým pádom je teplotná odozva rýchlejšia a následne je možné využívať vyššiu rýchlosť snímania [21]. Ak je zaznamenávaný teplotný rozdiel medzi vzorkou a referenciou, ktorý je spôsobený fázovou premenou vo vzorke, je energia dodávaná do vzorku väčšia až do tej doby, kým je teplotný rozdiel menší než hodnota prahovej teploty väčšinou $< 0,01$ K. Príkone je zaznamenávaný za jednotku času ako funkcia teploty či funkcia času alebo zjednodušene to môžeme vyjadriť, že príkon je úmerný tepelnej kapacite vzorky [24].

2.3.5.5 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria (TMDSC)

Teplotne modulovaná kompenzačná kalorimetria (TMDSC) zahŕňa skladanie nelineárnych sínusových modulácií proti tradičnej rýchlosti ohrevu u DSC, kde teplota s časom narastá. Konštantný profil ohrevu poskytuje informáciu o celkovom tepelnom toku, zatiaľ čo sínusový profil dáva informáciu o tepelnej kapacite odpovedajúcej rýchlosti teplotnej zmeny. Tepelná kapacita je zložka celkového tepelného toku a je všeobecne udávaná ako vratný (reverzný) tepelný tok a kinetická zložka, funkcia teploty na čase, ako nevratný (nereverzný) tepelný tok.

Delenie celkového toku na vratný (reverzný) a nevratný (nereverzbný) je ovplyvnené experimentálnymi podmienkami, hlavne vtedy keď nastáva časovo závislá nevratná fenoména. Všeobecne nereverzbný signál môže byť využitý na odhalenie prítomnosti ireverzibilných procesov, ako sú chemické reakcie (oxidácia, vyparovanie) alebo nerovnovážne fázové prechody (chladná kryštalizácia) [21]. TMDSC je technika, ktorá ponúka množstvo výhod oproti štandardnému DSC ako napríklad redukcii entalpiekej relaxácie alebo zvýšenie citlivosti. Má vyššiu citlivosť preto sa v praxi využíva napríklad na skúmanie sklenených prechodov, meranie tepelnej kapacity a tepelného toku v jednom experimente [27].

2.3.6 Termická analýza pri štúdiu biopolymérov a jej využitie v praxi

Publikácií a kníh [28-37] k tejto tematike je obrovské množstvo preto nasledujúci zoznam zahŕňa iba tie najdôležitejšie pre názornú demonštráciu využitia TG a DSC v praxi.

2.3.6.1 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

- Jouon, a kol. skúmali sodnú soľ kyseliny hyaluronovej (HYA) a to jej reorganizáciu pri hydratácii a jej relatívnu vlhkosť, ktorá sa používa v kozmetickom priemysle. HYA vysušovali na teflonových podložkách čím vytvárali film. Zistili, že pri vlhkosti 50-65% sa na filme absorbovala len voda nemrznúca, ale pri vlhkosti 88% sa už javila aj voda mrznúca.
- S. Takigami a M. Takidgami využívali DSC pre štúdium derivátov HYA sieťovitého charakteru (cross-linked) vytvoreného za pomoci formaldehydu. Predmetom bolo dokázať 3 typy vody a to voľnú neviazanú mrznúcu, viazanú mrznúcu a viazanú nemrznúcu, čo sa aj potvrdilo
- Karolína Benešová a kol. využívali DSC na skúmanie termálnych a termo oxidatívnych chovaniach sodnej soli kyseliny hyaluronovej a jej n-hexyl, n-decyl, n-tetradecyl a hexadecyl éterov. Ukázalo sa, že všetky *n*-alkyl deriváty zapríčinili zníženie počiatkovej teploty primárneho kroku termodegradácie oproti nesubstituovanej kyseline hyaluronovej, ale na druhej strane zapríčinili zníženie hmotnostného úbytku behom oboch dejov (termálnych a termooxidatívnych) prostredníctvom zmeny usporiadania systému vodíkových väzieb.
- Berthold, J. a kol. skúmali sorpciu vlhkosti na rôznych typoch derivátoch celulózy ako funkciu relatívnej vlhkosti vzdušnej vlhkosti na vplyv počtu iónov a rôzne nabitých skupín na absorpčnom mechanizme. Z experimentu bolo vydedukované, že všetky typy testovaných derivátov celulózy mali vrstvu nemrznúcej vody interagujúcej v blízkosti väzbových miest, kde nasledovne na to môže voda mrznúca obklopovať túto vrstvu za podmienky prítomnosti nabitých skupín. Typy iónov a elektrónových párov ovplyvňujú obsah a vlastnosti absorbovanej vody.
- J. Berthold a kol. študovali fyzikálne vlastnosti sorbovania vzdušnej vlhkosti na lignino-celulózových materiálov. Stanovovali chovanie absorpcie a určenie typ molekúl vody (viazaná mrznúca alebo viazaná nemrznúca) absorbovanej polárnymi molekulami (OH^- , COO^- , SO_3^-) s pridruženými iónovými pármami (H^+ , Na^+ , Ca^{2+}).

Zistili, že absorpcia na lignino-celulózových materiáloch je založená na chemickom zložení a kryštálovom usporiadaní systému. Experiment potvrdil predpoklad základnú ideu, že voda môže byť absorbovaná na špecifických miestach a to na hydroxyloch, nabitých časticiach ako karboxylová či sulfónová kyselina

2.3.6.2 Termogravimetria

- J. Kučerík a kol. využili TG na štúdium vplyvu rôznych modelových zlúčenín (aromatické látky, organické kyseliny, alkány, ketóny) na termooxidatívne vlastnosti lignitových humínových kyselín. Bolo zistené, že väčšina z pridaných zlúčenín ovplyvnila ich samotnú stabilitu pri deji už v relatívne nízkych koncentráciách
- M.E. Sanchez a kol. využívali TG na analýzu pri štúdiu a porovnávaní spalín splaškového kalu, zvieracích výlučkov a pevných častíc komunálneho odpadu. Pomocou tejto metódy zistili, že tieto bio odpady sú využiteľné aj ako materiál na vykurovanie. Poukázali, že TG je veľmi rýchla a účinná metóda pre ďalšie skúmanie rýchlo sa rozvíjajúcich materiálov biopalív.
- S.M. Pourmortazavi a kol. použili TG pre skúmanie tepelnej stability energetických materiálov ako je nitrocelulóza a to na termodegradáciu pre poznatky o uchovávaní týchto látok. Zistili, že tepelná stabilita nitrocelulózy je okolo teploty 192°C. Bolo to podložené teóriou aktivačnej energie podľa Ozawu a využili neizotermických termogravimetrických experimentov a stanovenie výsledkov.

2.3.7 Reakčná kinetika

Pri štúdiu kinetiky reakcií a procesov sú veľmi často využívané termoanalytické metódy. Mechanizmy týchto procesov sú často veľmi zložité alebo sa nedajú vôbec popísať jednoduchým kinetickým modelom. Vyskytujú sa v zložitých viacnásobných krokoch o rôznych podmienkach. Pre deje založené na tzv. jednokrokovej aproximácii je často používaný buď bezmodelový alebo modelový prístup.

2.3.8 Jednokroková aproximácia

Tento dej je všeobecne zobrazovaný ako rýchlosť procesu v kondenzovanej pare, kde je zobrazovaný ako funkcia teploty a stupňa premeny:

$$\frac{d\alpha}{dt} = \phi(T, \alpha) \quad (1)$$

Kinetika procesov v pevnej fáze popísaná rovnicou (1) a môže byť vyjadrená ako produkt dvoch separovateľných funkcií na sebe nezávislých prvej $k(T)$ výhradne závislej na teplote a druhej zas len závislej na stupni premeny $f(\alpha)$:

$$\phi(T, \alpha) = k(T)f(\alpha) \quad (2)$$

Kombináciou rovníc (1) a (2) môže byť pomer viacstupňového komplexného procesu zapísaný ako:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (3)$$

Rovnosť (3) je väčšinou nazývaná hlavnou rýchlostnou rovnicou. To sa podobá jedнокrokověj rýchlostnej rovnice, i keď je to zobrazovanie rýchlosti komplexne kondenzovanej fázy procesu. Jednokrokový dej aproximácie tak nadobúda v náhrade v skutku komplexný súbor kinetických rovností zhrnutý do jedinej jedнокrokověj kinetickej rovnice. Toto je prvá vlastnosť jedнокrokověj aproximácie. Teplotná funkcia v (3) sa väčšinou považuje za stály pomer a funkcia stupňa premeny sa považuje zas za časť zodpovednej za mechanizmus rovnice [38]. Viac menej tento celý výklad môže byť považovaný za nesprávny, pokiaľ matematická formulácia jedнокrokověj aproximácie $k(T)$ a $f(\alpha)$ len jednoducho predstavuje teplotu a premeny pohybových zložiek hyperplochy, ktorá je zobrazovaná ako závislosť premeny, ktorá je funkciou času a teploty [39]. Len pre málo výnimiek je funkcia teploty vyjadrená arrheniovou rovnicou:

$$k(T) = A \exp\left[-\frac{E}{RT}\right] \quad (4)$$

Kde A a E sú považované za pred exponenciálny faktor a aktivačná energia, T za absolútnu teplotu a R za plynovú konštantu. To bolo ospravedlnené dovtedy, pokiaľ $k(T)$ nebolo konštantné a E bola možno mechanisticky interpretovať v termíne voľnej energetickej bariéry. Tu už nie je žiadny dôvod byť obmedzovaným arrheniovým vzťahom a budú použité dva nearrheniové vzťahy ako funkcie teploty, ktoré už boli navrhované.

$$k(T) = AT^m \quad (5)$$

$$k(T) = Ae^{DT} \quad (6)$$

Kde m a D sú nastaviteľnými parametrami. Veľkou výhodou použitia rovníc (5) a (6) je, na rozdiel od (4) to, že teplotný integrál môže byť vyjadrený v uzavretom tvare a nie ako funkcia teploty. Prakticky každá funkcia je spojená s predstavou o reakčnom mechanizme [40].

Termoanalytické metódy (DSC, TG) poskytujú súhrnný signál všetkých reakčných krokov vyskytujúcich sa vo vzorke. Pre rovnaký proces a časovo-teplotný režim môžu byť zmeny reakčných rýchlostí získaných rozličnými metódami rozdielne. Z tohto dôvodu v kinetickom popise DSC experimentálnych dát je urobená analýza pomeru a množstva uvoľneného alebo absorbovaného tepla. Analogicky v kinetickom popise TG je analyzovaný pomer a množstvo hromadného úbytku [38].

2.3.9 Izokonverzné metódy

Izokonverzné metódy môžu byť najlepšie spoznatelné podľa ich predstaviteľov. Metódy podľa pánov Friedmana, Ozawy a Flynn a Wall či Šimona. Zaujímavé je, že všetky tri metódy boli vypracované ľuďmi zaoberajúcimi sa tepelnou degradáciou polymérov a od tejto doby sú používané pri kinetickej štúdií polymérov. Izokonverzné metódy vyžadujú prevádzanie sérií experimentov v rôznych teplotných programoch a vynášať hodnoty aktivačnej energie ako funkcie stupňa premeny. Aktivačná energia ma často kolísavý priebeh a rozsah konverzií. Potenciál izokonverzných metód bol prijatý ako popredná analýza energetických závislostí a demonštrovala, že tieto metódy môžu byť používané pre skúmanie mechanizmov

kinetických procesov. Tieto dva rysy dali základ izokonverznej kinetickej analýzy alebo lepšie povedané bezmodelovej kinetiky.

Hlavná myšlienka izokonverznej analýzy je veľmi jednoduchá. Sú potrebné len dva základné predpoklady:

1. Intenzita procesu v kondenzovanom stave je všeobecne funkciou teploty a stupňa premeny, ako znázorňujú rovnice (1)-(3). Hlavný dôsledok rovnice (3) je, že je to funkcia stupňa premeny $f(\alpha)$ pevne držiaca hodnotu premeny α pre rôzne teploty či teplotné programy, to znamená, že mechanizmus je výhradne funkciou premeny a nie teploty.
2. Aktivačné parametre sú získané zo súboru kinetických pochodov závislých na čase a teplote (pre izotermické merania). Čas a spotreba tepla (pre integrálne a prírastkové (inkrementálne) metódy s lineárnym teplotným prírastkom) alebo z reakčných rýchlostí a teploty (pre odlíšenie friedmanovej metódy). Vyhodnotenie je prevádzane pri pevnej premene [40].

2.3.9.1 Izotermické izokonverzné metódy

Pre izotermické-izokonverzné metódy je teplotný pomer konštantný. Po separácii premenných z rovnice (3) môže byť tento vzťah prepísaný do tvaru:

$$\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = k \int_0^{t_{\alpha}} dt \quad (7)$$

Kde t je čas potrebný na dosiahnutie premeny α . Ak primitívnu funkciu integrálu na ľavej strane rovnice (7) označíme ako F dostaneme:

$$F(\alpha) - F(0) = kt_{\alpha} \Rightarrow t_{\alpha} = \frac{F(\alpha) - F(0)}{k} \quad (8)$$

Teplotná závislosť pomeru konštanty k je väčšinou vyjadrená pomocou Arrheniovej rovnice (4). Kombináciou (4) a (8) dáva výraz pre čas:

$$t_{\alpha} = \frac{1}{A_{\alpha} \exp\left[\frac{-B_{\alpha}}{T}\right]} \quad (9)$$

Pre aktivačné parametre A_{α} a B_{α} platí:

$$A_{\alpha} = \frac{A}{F(\alpha) - F(0)} \quad (10)$$

$$B_{\alpha} = \frac{E}{R} \quad (11)$$

Dolný index α a t pri A a B určujú hodnoty súvisiace s pevnou hodnotou premeny. Z toho dôvodu parametre A_{α} a B_{α} môžu byť získané zo súboru izotermických meraní, dokonca priamym použitím rovnice (9) alebo z logaritmickkej transformácie vzťahu $\ln t_{\alpha} = f\left(\frac{1}{T}\right)$.

2.3.9.2 Izokonverzné metódy pri lineárnom zahrievaní

1. Integrálne metódy

Pre neizotermické podmienky kde kombináciou rovníc (3) a (4) dostávame:

$$\frac{d\alpha}{dt} = kf(\alpha) = A \exp\left[-\frac{E}{RT}\right] f(\alpha) \quad (12)$$

Po separácii premenných a samotnej integrácie získame vzťah:

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = A \int_0^{t_\alpha} \exp\left[-\frac{E}{RT}\right] dt \quad (13)$$

Keď zoberieme v úvahu rovnice (10-13) môžeme získať výsledný vzťah:

$$1 = A_\alpha \int_0^t \exp\left[-\frac{B_\alpha}{T}\right] dt \quad (14)$$

Rovnica (14) platí pre každý teplotný režim a pomocou neho môžeme vypočítať čas t_α potrebný pre dosiahnutie premeny (konverziu) alfa. Pre lineárny ohrev, teplota pece môže byť vyjadrená ako:

$$T_f = T_0 + \beta t \quad (15)$$

Kde T_f je teplota pece, T_0 je štartovacia teplota merania, β stojí za spotrebou tepla. Väčšinou sa predpokladá, že teplota vzorky T je rovná teplote pece $T_f = T$, tak z rovníc (13) a (14) získame :

$$\beta = A_\alpha \int_0^{T_\alpha} \exp\left[-\frac{B_\alpha}{T}\right] dT \quad (16)$$

Kde T je teplota v danej dosiahnutej fixnej konverzií α , najnižší integračný limit rovnice (16) je obvykle stanovený $T_0 = 0 \text{ K}$ odvtedy kým nie je žiadny proces vyskytujúci sa vo vzorke pri štartovacej teplote experimentu. Teplotný integrál na pravej strane rovnice (16) nemôže byť vyjadrený v uzavretom tvare. Flynn-Wall-Ozawova (FWO) a Kissinger-Akahira-Sunosova (KAS) metódy môžu byť odvodené z aproximácie pre teplotný integrál (16). Kinetické parametre sú získané zo súboru izokonverzných metód pre rôzne spotreby tepla. Z linearizácie rovnice (16) dostávame:

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_\alpha^a}\right) = f\left(\frac{1}{T_\alpha}\right) \quad (17)$$

Kde $a = 0$ pre FWO metódu a $a = 2$ pre KAS metódu. Z rovnice (16) môžu byť odvodené nelineárne izokonverzné metódy.

2. Diferenciálne metódy

Z lineárneho teplotného programu rovnice (12) môže získať:

$$\left(\frac{d\alpha}{dt}\right)_\alpha = \left(\beta \frac{d\alpha}{dT}\right)_\alpha = [A_k f(\alpha)] \exp\left[-\frac{E}{RT}\right] = A_\alpha \exp\left[-\frac{B_\alpha}{T_\alpha}\right] \quad (18)$$

Po logaritmickej pretvoreni rovnice (18) sa väčšinou využíva tvar:

$$\ln\left(\beta \frac{d\alpha}{dT}\right)_\alpha = \ln A_\alpha - \frac{B_\alpha}{T} \quad (19)$$

Z rovnice (19) následné vyplýva závislosť $\ln\left(\beta \frac{d\alpha}{dT}\right) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ a mala by byť lineárna. Táto metóda je pomenovaná po jej autorovi ako „Friedmanova“ [41].

3. Prírastkové (inkrementálne) metódy

Friedmanové metódy používajú okamžitý prírastok hodnoty ale metóda je veľmi citlivá na šum a má sklony sa zanášať numerickou chybou ním vzniknutou. Používaním prírastkových metód môže byť toto nebezpečie odstránené. Nedávno bola navrhnutá integrálna izokonverzná metóda a to pre program lineárneho ohrevu rovnice (13), kde je integrovaný zvyšok $\alpha_1 - \alpha_2$. Vznikne následný vzťah:

$$\beta = \frac{A}{F(\alpha_2) - F(\alpha_1)} \int_{T_1}^{T_2} \exp\left[-\frac{B_\alpha}{T}\right] dT = A_\alpha \int_{T_1}^{T_2} \exp\left[-\frac{B_\alpha}{T}\right] dT \quad (20)$$

V tomto prípade definícia parametru A_α je zrejmá z rovnice (20), kvôli integrácií je vplyv experimentálneho hluku eliminovaný vo vysokej miere. Pre nekonečne malé prírastky rovnicu (20) degenerujeme do rovnice (18) a ak sústava $\alpha_1 = 0$ a $T_1 = 0$ potom rovnicu (20) degenerujeme do rovnice (16). Z rovnice (20) môže byť odvodená prírastková izokonverzná metóda k tomu aby zodpovedala za zmenu aktivačnej energie [41].

3 CIEĽ PRÁCE

Táto práca nadväzuje na predchádzajúce experimenty [42] kde boli za pomoci metód termickej analýzy charakterizované a kvantifikované množstvá a typy vody prítomnej v roztokoch HYA. V predchádzajúcej práci boli využité predovšetkým rozdiely medzi entalpiami teplôt topenia, vedúce k záverom o množstve nemrznúcej vody okolo 0,8 g vody na g HYA; neskoršie experimenty s odparovaním potom naznačovali, že v koncentračnej oblasti okolo 0,4 g/l dochádza k uvoľňovaniu energie pravdepodobne spojennej s tvorbou nových (silnejších) interakcií medzi molekulami HYA. V predkladanej práci predpokladáme, že charakter vody v jednotlivých hydratačných vrstvách by sa mal meniť s narastajúcou vzdialenosťou od biopolymerov, ináč povedané, predpokladáme koncentračnú závislosť štruktúry vody v okolí HYA. V súlade s literárnymi zdrojmi potom predpokladáme, že s postupným odstraňovaním vody sa bude meniť jej odparovacia aktivačná energia E_a (alebo lepšie povedané energia desorpcie vody). Táto energia by sa teda mala meniť v závislosti na type vody desorbovanej z hydratačnej obálky a tým teda slúžiť k identifikácii jej jednotlivých štruktúrnych typov. Vychádzame z jednoduchého predpokladu $H_2O(l) \rightarrow H_2O(g)$, teda podmienok jednokrokového deja. Tento predpoklad je opodstatnený vzhľadom k experimentálnym podmienkam (minimálna veľkosť navážky znižujúci vplyv difúzie na stanovované parametre, konštantný tlak, a prietok plynu v TG a DSC), ktorý nám dovoľuje týmto pádom využitie izokonverzných metód pre stanovenie vyššie zmienených kinetických parametrov. Ďalším predpokladom je, že pri odparovaní vody nedochádza ku zmenám štruktúry vody spôsobeným odparením susedných hydratačných vrstiev.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Pre experiment boli použité frakcie kyseliny hyalurónovej v práškovej podobe o molekulovej hmotnosti 650 kDa, ktorá bola dodaná firmou Contipro Dolní Dobrouč.

4.1 Príprava vzoriek HYA/voda

Všetky DSC experimenty boli prevádzané v hermeticky uzatvárateľných alumíniových panvičkách (T_{zero}). Bola navážená HYA o hmotnosti od 3 do 5 mg a pridaný nadbytok milliQ vody. Takto pripravená vzorka HYA bola pri laboratórnej teplote (23°C) odparená na požadovanú konečnú koncentráciu vody. Koncentrácia bola definovaná nasledujúcim vzťahom:

$$w = 100 * \left(\frac{m_{voda}}{m_{HYA}} \right) \left[\frac{g}{g} \right]$$

Pričom w je koncentrácia vody vo vzorke, m_{vody} je celková hmotnosť vody vo vzorke, ktorá zahŕňa aj prirodzenú vzdušnú vlhkosť stanovenú za pomoci TGA (viz. kapitola 1.3.4)

V našom prípade boli používané hmotnostné percentá vody 30, 300, 600 a 1000% iným slovom povedané 0,03; 0,3; 0,6 a 1 g vody na gram HYA. Po dosiahnutí požadovanej koncentrácie boli panvičky hermeticky uzavreté, ponechané 24 hodín stať pri laboratórnej teplote (25°C). Tento čas je uvádzaný ako dostačujúci pre úplnú redistribúciu vody vo vzorke.

4.2 Termická analýza vzoriek

Pre termickú analýzu boli zvolené prístroje TG Q5000IR a DSC Q200 od firmy TA Instruments (New Castle, Delaware, USA). Data boli spracované softwarom Universal Analysis 2000.

4.2.1 DSC

Teplotný rozsah bol zvolený od -50°C po 220°C rôznou rýchlosťou ohrevu a chladenia (β). Zatiaľ čo chladenie prebiehalo jednou rýchlosťou 10°C/min z 27°C na -50°C, ohrev rôznymi rýchlosťami tj. 1, 3, 5, 7, 10 a 15°C/min, od -50°C do 220°C. Experimenty boli prevádzané v dusíkovej atmosfére s prietokom 5ml/min. Pred experimentom bolo DSC teplotne a entalpicky kalibrované na čistú destilovanú vodu (milliQ) a štandard india. Pred zahájením merania bolo vičko panvičky prepichané hrotom pre umožnenie samotného deja odparovania, uložené do cely a ako referencia bola použitá prázdna hermeticky uzavretá alumíniová panvička. Experiment bol opakovaný 6 krát pre danú koncentráciu vyššie uvedenými rýchlosťami ohrevu β

4.2.2 TG

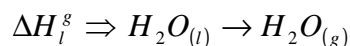
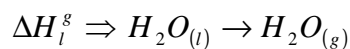
Počiatočná teplota v cele TG sa pohybovala v rozmedziach 29-32°C a teplotne maximum bolo zvolené na 250°C. Prietok plynu na váhach bol nastavený na 5 ml/min. Boli použité identické vzorky HYA ako pri DSC. Vičko panvičky bolo prepichané hrotom, položené na vopred vytárovanú platínovú panvičku a zahájené meranie.

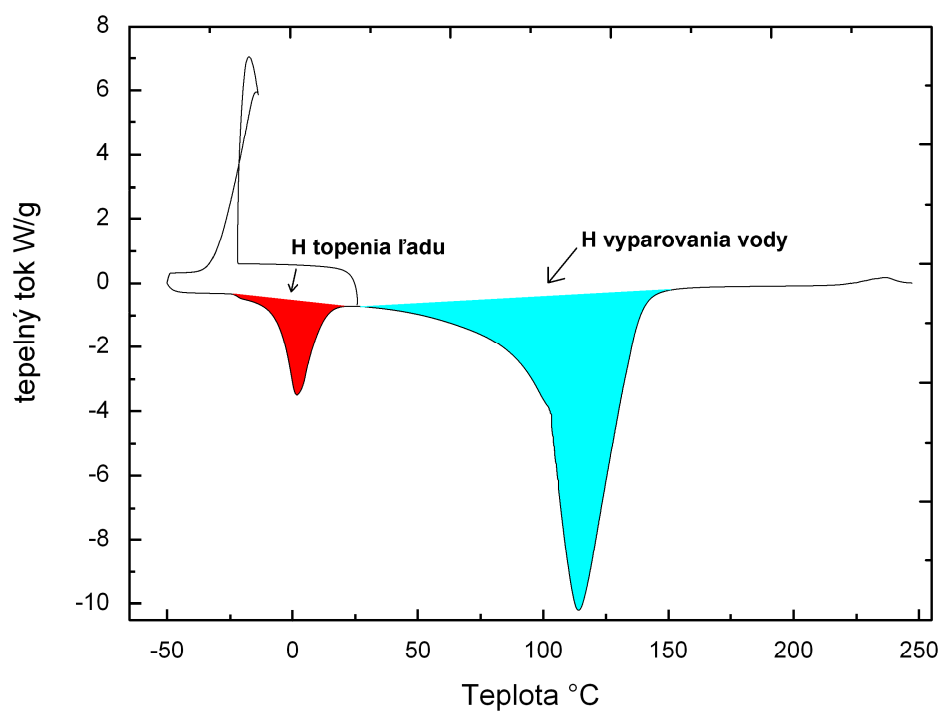
4.2.3 Kinetika

Kinetika odparovania bola vyhodnocovaná pomocou programu Excel, kde boli importované dáta z TA Universal Analysis 2000. Bol zvolený teplotný rozsah integrácie reakcie (pre DSC to bolo väčšinou od 0°C po 120-160°C v závislosti na rýchlosti ohrevu (čím nižšia rýchlosť tým nižšia teplota vyparovania) a výsledná závislosť bola normalizovaná na stupeň premeny v intervale $\langle 0;1 \rangle$. Analogicky boli vyhodnotené TG záznamy. Každá teplota teda predstavovala istý stupeň premeny. Nami bol zvolených každých 5% hmotnostného úbytku (TG) alebo premeny (DCS) označený ako α , ku každému α pripadá špecifická teplota. Hodnoty získané z grafu (Obr.13) boli využité k výpočtu E_a pomocou vzťahu „Ozawa“ pre kinetiku v pevnej fáze $\log \beta = \log \frac{k_\alpha \cdot E_a}{g(\alpha)R} - 2,135 - \frac{0,475E_a}{RT}$, kde $\log \beta$ je logaritmus rýchlosti ohrevu, R je plynová konštanta, T je daná teplota experimentu. Pre výpočet aktivačnej energie osamostatníme vzťah $-\frac{0,475E_a}{RT}$ na pravej strane. Následne na ľavej strane dostaneme $\log \beta - \log \frac{k_\alpha \cdot E_a}{g(\alpha)R} + 2,135 = k$, kde k je smernica priamky spojnice trendov grafu. Rýchlosť ohrevu sa zlogaritovala a teploty boli prevedené na kelviny a podelené 1000. Hodnoty boli vynesené do grafu $\log \beta = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ (obr.14) a E_a danej percentuálnej premeny α bola potom vypočítaná jej linearizáciou pomocou vzťahu $E_a = \frac{k \cdot R}{0,457}$ (obr.15-17).

5 VÝSLEDKY

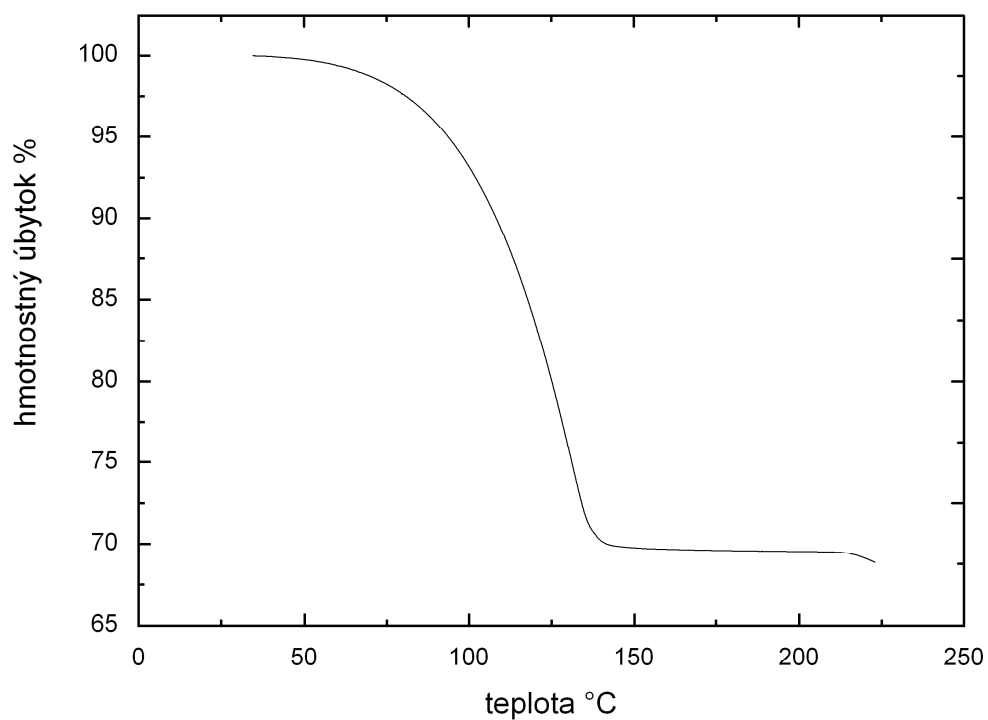
Vzorový záznam DSC (Obr. 10) zobrazuje priebeh celého DSC experimentu vrátane samotného odparovania. Počiatok experimentu bol na teplote 27°C chladienie prebiehalo konštantnou rýchlosťou 10°C/min na teplotu -50°C (horná krivka). Na počiatku záznamu je zrejмый nárast signálu typický pre každý DSC záznam, ktorý je úmerný rýchlosti ohrevu β , tepelnej kapacite panvičky c_p a hmotnosti vzorky m . Pri teplote okolo -25°C vidíme exotermický pík odpovedajúci kryštalizácií prítomnej mrznúcej vody. Nepravidelnosť píku bola spôsobená náhlým uvoľnením entalpie alebo ináč povedané energia sa uvoľnila pri tvorbe kryštálov vody a spôsobila momentálne zvýšenie teploty vzorky – tá bola v momentálnom kontraste ku zvolenému teplotnému režimu. Jedná sa o takzvané podchladenie (supercooling effect). V časti od -50°C po -40°C sledujeme priebeh bez zmeny entalpie. Potom bola teplota zvyšovaná, ako je viditeľné na dolnej krivke. Od teploty okolo -10°C do 0 nastáva dej topenia ľadu a v zázname (Obr. 10) je zobrazený ako entalpia topenia H (pík č.1). Následne nastupuje dej odparovania v teplotnom rozsahu od cca 3°C po 100-130°C, záleží na rýchlosti ohrevu, ale záznamy z prístroja sú podobné (rozdielne teploty, plochy píkov vyparovania, entalpie vyparovania) Aj v tomto prípade pozorujeme spotrebu tepla potrebného na fázovú premenu, tj. vyparenie vody. V zázname na tento dej poukazuje druhý pík a entalpia vyparovania (Obr.10). Pík odparovania bol integrovaný a normalizovaný (Obr. 12). Obidva píky je možné sumarizovať v nasledujúcich rovniciach - Prvý pík predstavuje endotermický dej premeny ľadu na vodu, entalpiu premeny $\Delta H_s^l \Rightarrow H_2O_{(s)} \rightarrow H_2O_{(l)}$, druhý fázovú premenu vody na vodnú paru.



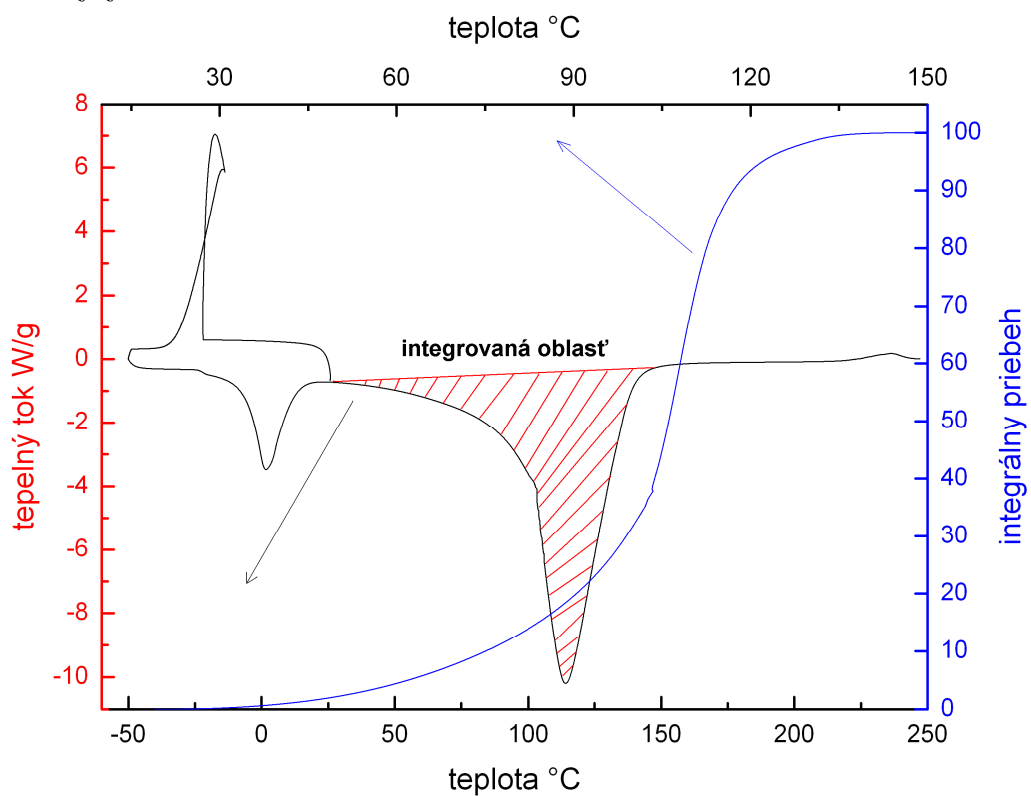


Obrázok č. 10 záznam z DSC.

Záznam TG (obr. 11) nám zobrazuje hmotnostný úbytok vody zo štruktúry HYA v čase. Na začiatku sledujeme pomalý nástup odparovania vody, v oblasti okolo 85°C nastáva prudký pokles hmotnosti až po teplotu cca 150°C, od ktorej sledujeme lineárny priebeh a konštantnú hmotnosť. Koniec experimentu je posunutý na základne rýchlosti ohrevu β .

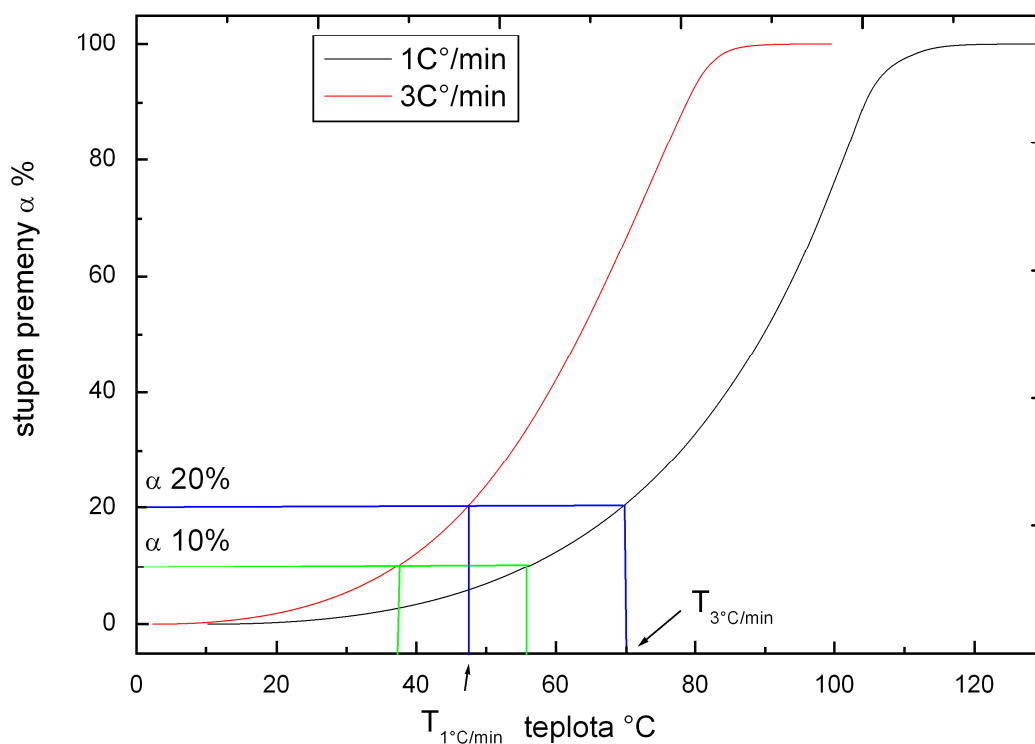


Obrázok č. 11 záznam TG.



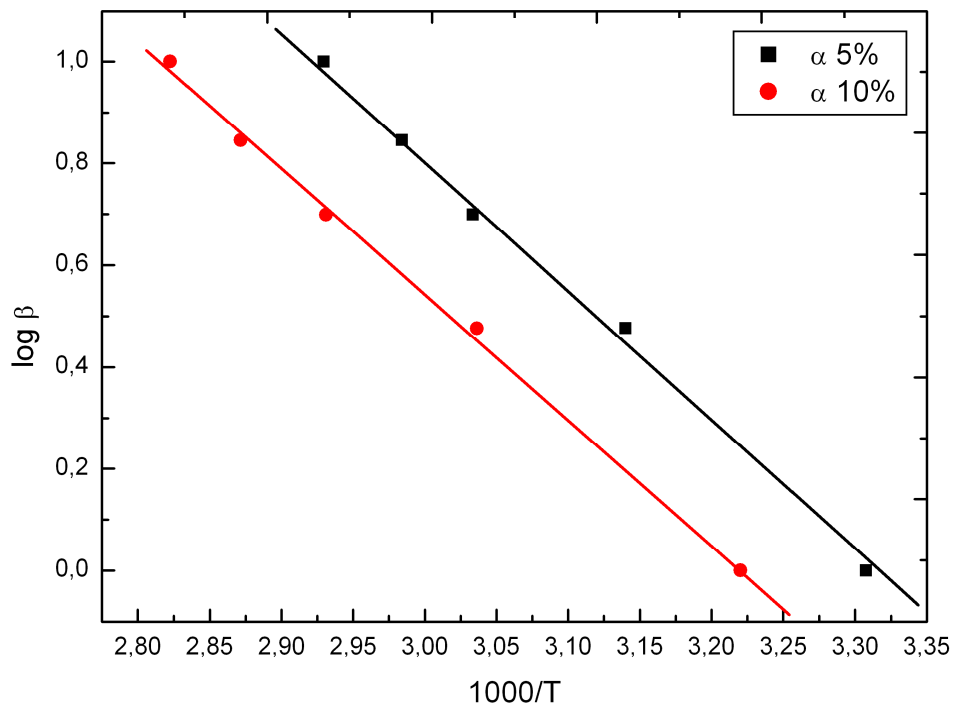
Obrázok č. 12 integrálny priebeh vyparovania vody vyšrafovaná časť predstavuje plochu, ktorá bola následne integrovaná a jej priebeh zaznamenaný v grafe modrou krivkou.

Pre názornejšie zobrazenie priebehu závislosti teploty a rýchlosti ohrevu β normalizované na stupeň premeny α bol vytvorený graf $\alpha = f(T)$ (obr. 13), na ktorom boli popísané rozdielne teploty istého (rovnakého) stupňa premeny v závislosti na rýchlosti ohrevu β . Ako vidíme s narastajúcou rýchlosťou ohrevu β sa koniec reakcie posúva smerom k vyšším teplotám.



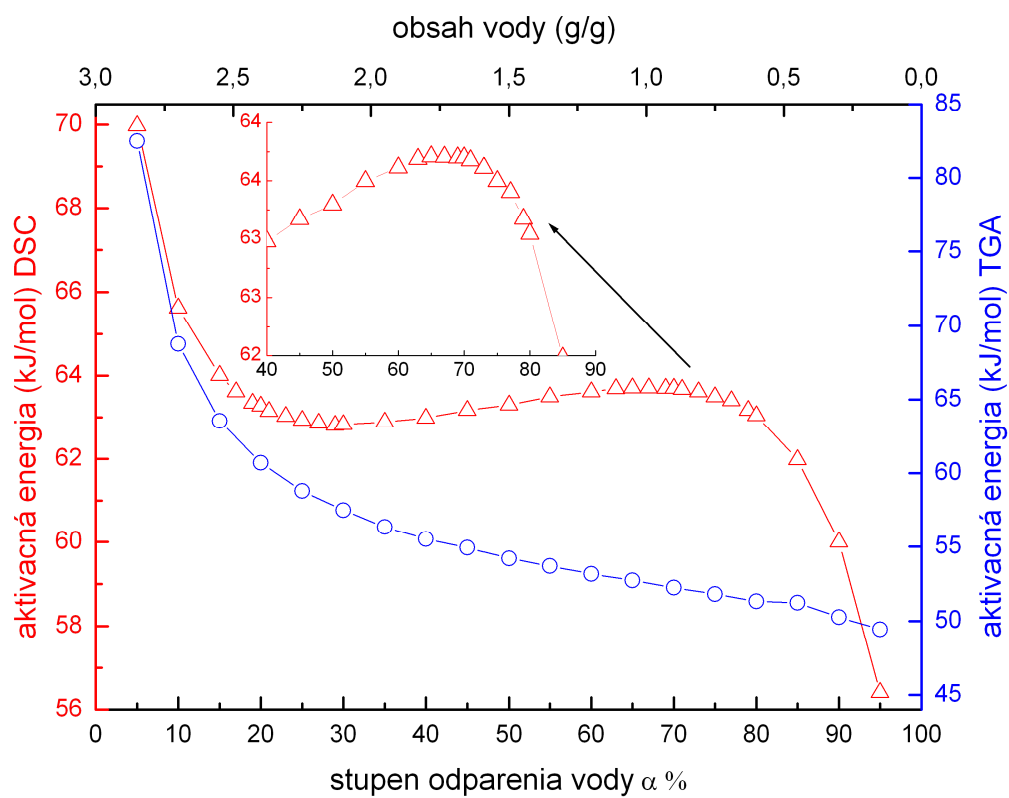
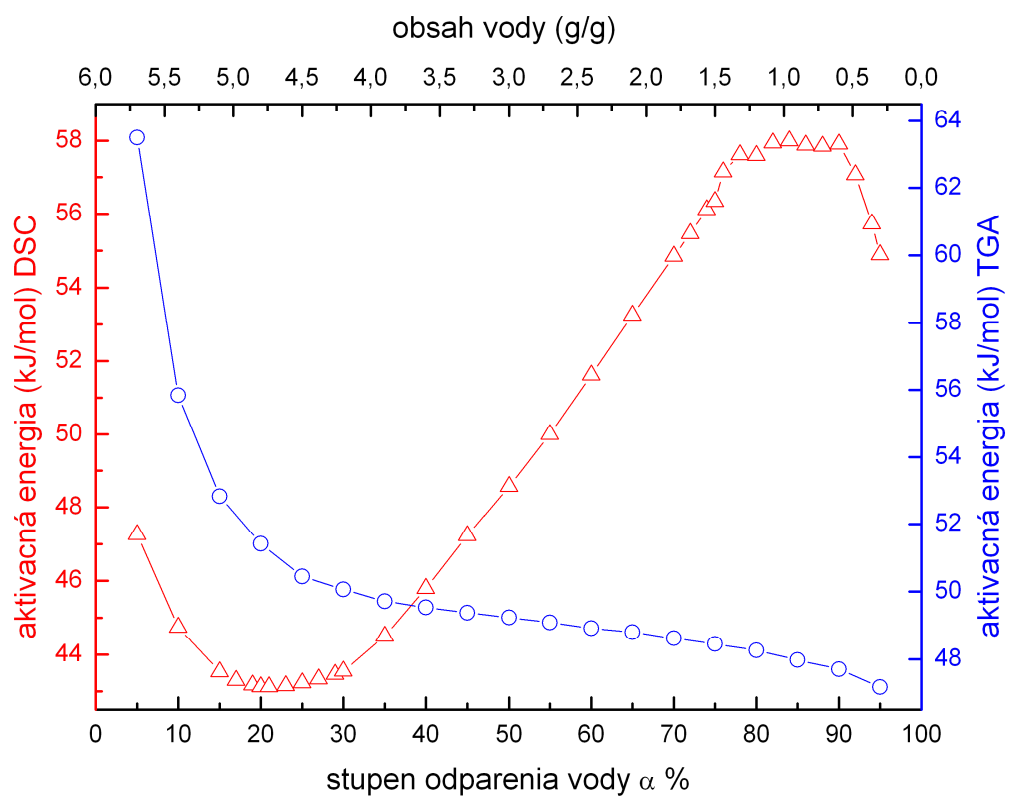
Obrázok č. 13 závislosť stupňa premeny na priebeh rýchlosti ohrevu.

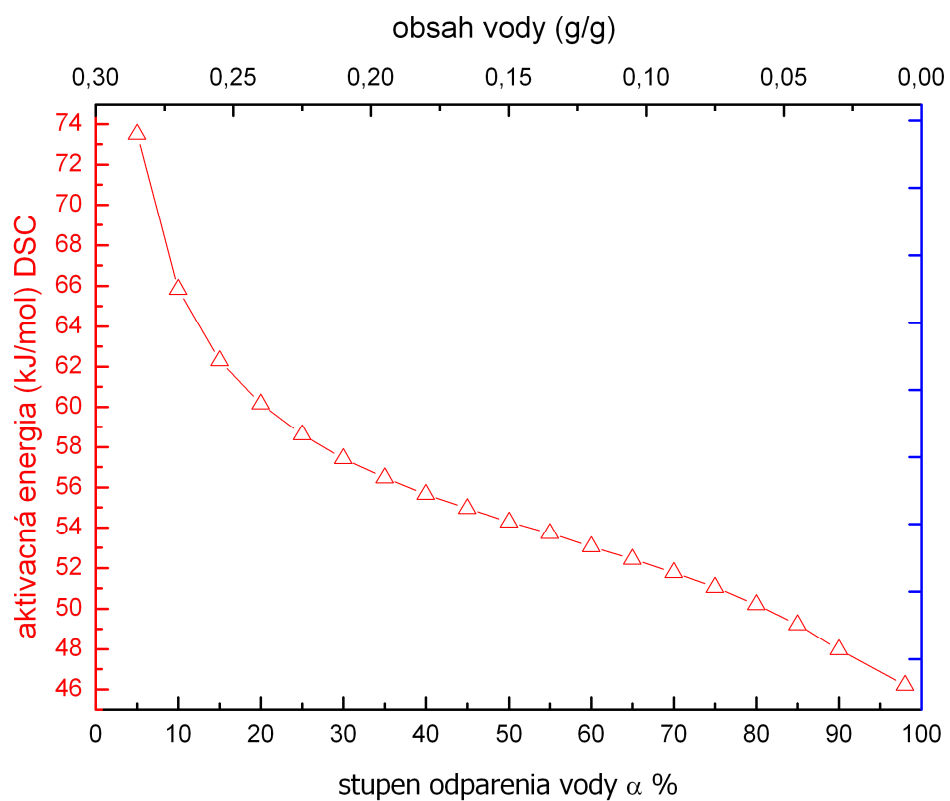
Po odčítaní daných teplôt jedného stupňa premeny pre všetky rýchlosti vo zvolenom rozsahu percentuálnej premeny α boli dáta zosumarizované a následne pretransformované do potrebného tvaru. Rýchlosti ohrevu β zlogaritmované a teploty premenené na kelviny a podelene 1000. Podľa vzťahu $\log \beta = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ bol vytvorený graf a body preložené lineárnou regresiou (obr. 14), z nich sme použili smernice priamok jednotlivých stupňov premeny na výpočet aktivačnej energie (E_a) daného stupňa odparenia vody z HYA. Celkový priebeh E_a zobrazujú grafy na obrázkoch 15-17.



Obrázok č.14 priebeh závislosti $\log \beta = f\left(\frac{1000}{T}\right)$.

Z výsledníc lineárnych regresíí bola následné vypočítaná aktivačná energia E_a a jej priebeh zobrazený v grafe (obr.15-17). Začiatok odparovania je spojený s miernym poklesom E_a potom nastáva nárast. V oblasti od 75 až 92% vidíme relatívne rovnakú oblasť E_a , ktorú nazveme plato. Za platom pozorujeme pokles. Lepšie to popisuje graf pre 600% obsah vody. Pri koncentrácií 30% vody vidíme klesavý priebeh aktivačnej energie s razantnejším nástupom. Následný priebeh od premeny $\alpha = 25\%$ má smernicu o niečo menej strmú. Nepozorujeme žiadne plato ani nárast energie.





Obrázok č.15-17 zobrazenie aktivačnej energie TG+DSC v závislosti na stupni premeny (koncentrácie HYA 600% + 300%+30% obsahu vody) Pomer je v gramoch vody na gram HYA v obrátenom pomere. Príklad pre 600% pripadá na gram HYA 0,6 g vody.

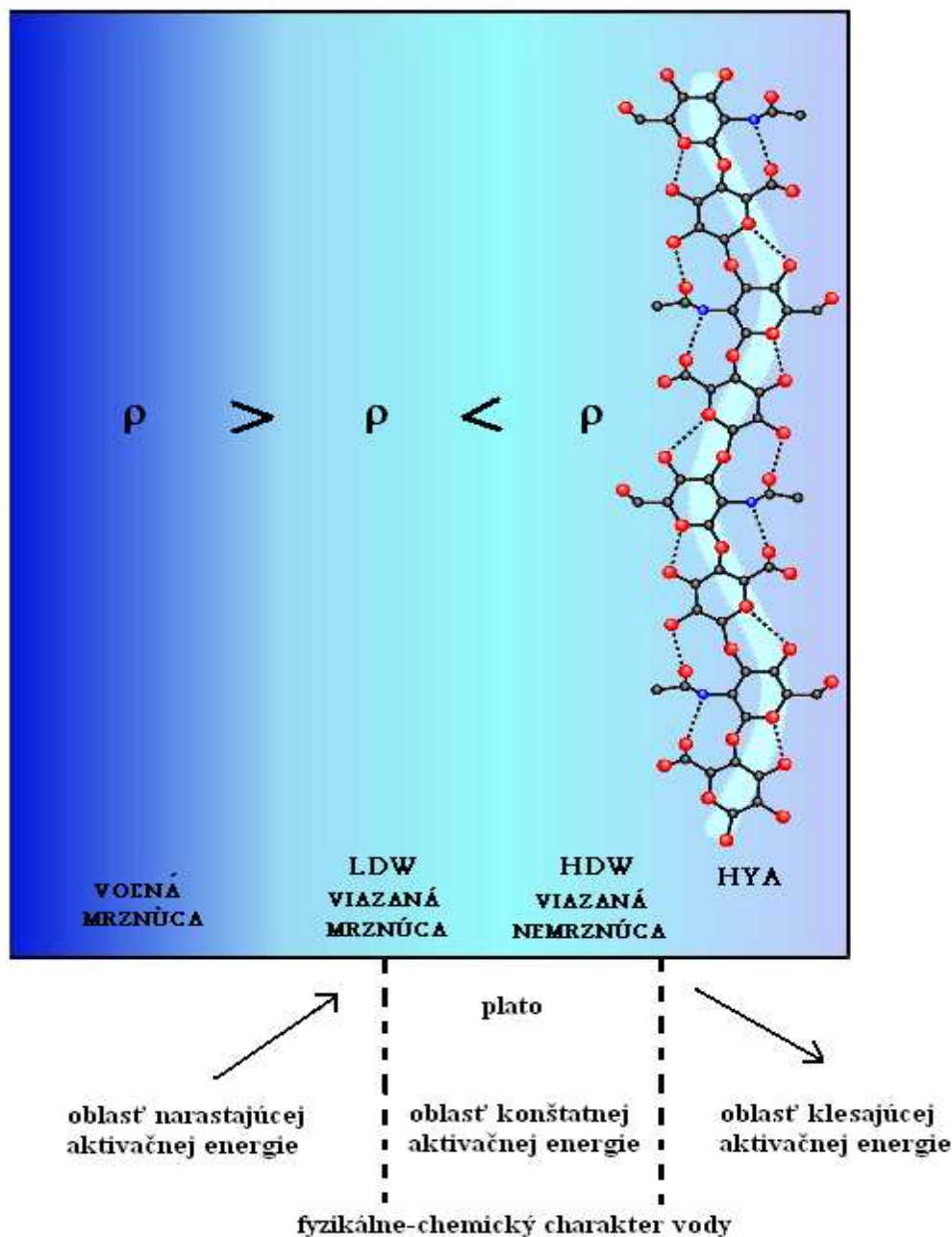
6 DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo pokúsiť sa využiť kinetických parametrov odparovania vody z HYA k identifikácii jednotlivých štruktúrnych typov vody (analogicky k záznamom DSC kde je možné identifikovať voľnú mrznúcu, viazanú mrznúcu a viazanú nemrznúcu). Presnejšie povedané, stanovili sme aktivačnú (desorpčnú) energiu týchto procesov, ako už bolo skôr popísané (Obr. 15-17).

V grafoch (Obr. 15-17) je vidieť priebeh E_a vypočítanej metódami TG a DSC. Metódy poskytli odlišné výsledky vzhľadom k faktu, že každá z technik meria iné parametre. Hodnoty E_a získané z TG analýzy odpovedajú pohľadu získanému z úbytku hmotnosti vzorky, závislosť ukazuje na mierne klesajúcu tendenciu, čo naznačuje, že v priebehu odparovania nedochádzalo k fluktuáciám hmotnostného úbytku s teplotou a časom. Na druhu stranu DSC meranie zahrnuje sumu entalpických vplyvov pôsobiach na vzorku ($\sum E_a$). Fluktuácia E_a v priebehu procesu tu naznačuje ovplyvňovanie odparovania vody aj inými vplyvmi než iba spotrebu energie na samotné odparenie vody. Zmeny aktivačnej energie v priebehu odparovania je možné predpokladať a to vzhľadom k faktu, že hydratačná obálka, tj. charakter štruktúry vody sa mení so vzdialenosťou od molekuly HYA. Nárast E_a je možné očakávať s vzhľadom na zvyšujúcu sa koncentráciu vplyvu elektrostatického náboja HYA, voda je ovplyvnená, jej desorpcia prebieha s väčšími energetickými nárokmi. Je nutné vziať do úvahy tiež fakt, že u 300% a 600% vzorkách sa už pravdepodobne nachádzame v oblastiach LDW, znížená hustota vrstvy má vplyv na jej tepelnú kapacitu, tj. vzniká tu ďalší energetický nárok na zvýšenie prísunu energie potrebnej k desorbci vody. Plato poukazuje na prítomnosť procesov, ktoré naopak energiu uvoľňujú. Jedným z vysvetlení môže byť postupné približovanie HYA molekulových segmentov a ich vzájomná interakcia (pravdepodobne intramolekulová) spojená s tvorbou vodíkových mostíkov a hlavne organizovanejšie štruktúry HYA. Tvorba vodíkových mostíkov je termodynamicky výhodnejšia než väzba vody na HYA. Tento proces vedie k zníženiu entropie celého systému a tým aj k uvoľneniu určitého množstva energie (analógia s kryštalizáciou). Postupné znižovanie E_a v závere procesu len túto úvahu potvrdzuje. Spojenie oboch vyššie zmienených závislostí, tj. E_a získaného z DSC a TG teda poukazuje na zaujímavý fakt. Aktivačné energie získané s využitím dvoch metód dávajú odlišné výsledky a môžu slúžiť ku štúdiu danej problematiky z rôzneho uhlu pohľadu. Ďalej je zrejmé, že využitie pojmu „aktivačná energia“ nie je naďalej udržateľná, jedná sa skôr o akýsi „efektívny koeficient desorpcie vody“ vzťahovaný na danú metódu. Z vyššie uvedeného je zrejmé, že skôr než samotné hodnoty, je dôležitý trend, ktorý vykazuje vzhľadom k hodnotám konverzie.

Obrázok 18 znázorňuje myšlienkový model, ktorý bol využitý pri interpretácii vypočítaných dát. Bol vytvorený z ref. [9], [10], [15], [16], [17], [18] a zahrňuje zjednodušený pohľad na hustotu vody obklopujúcu molekulu HYA. Hustota vody je úmerná jej tepelnej kapacite teda je možné predpokladať, že vyššia hustota implikuje nižšiu tepelnú kapacitu a naopak. Aj táto zjednodušená predstava potom odpovedá stanoveným parametrom, tj. znižovanie desorbčného koeficientu na začiatku procesu odparovania, potom jeho mierny nárast a opäť pokles. V týchto úvahách je problematický predpoklad, že s postupným odparovaním sa štruktúra zostatkovej vody nemení. Ďalším problematickým miestom je povrchové napätie vody, ktoré už môže v takto malých koncentráciách hrať významnejšiu úlohu. Posledným

o nič menej komplikujúcim parametrom je zmena konformácie molekuly HYA, ktorá môže významným spôsobom ovplyvniť naviazanie vody v primárnej hydratačnej obálke. Entalpické zmeny spojené so zmenou sekundárnej štruktúry HYA nie je pravdepodobne potreba uvažovať vzhľadom k ich malým hodnotám, nezrovnateľne menším než je desorbčná entalpie vody.



Obrázok č. 18 poukazuje na hydratovanú HYA. Jednotlivé typy vody vzťahnuté na jej hustotu a vzdialenosť od reťazca HYA. Spodná časť poukazuje na fyzikálny priebeh odparovania so znižujúcou sa koncentráciou vody vychádzajúci z grafu aktivačnej energie DSC. Jednotlivé typy vody nie sú separované pevnými hranicami, rozhrania sú flexibilné a môže dochádzať k ich prekrytiu. Z hľadiska hustoty vody je rozdelenie zrejme z obrázku kde voľná mrznúca voda má vyššiu hustotu ako voda LDW (viazaná mrznúca, ktorá má najnižšiu hustotu z týchto troch typov) a HDW (viazaná nemrznúca), ktorá je najbližšie k molekule HYA a má najvyššiu hustotu [18].

Pri experimentoch DSC pozorujeme rázny pokles aktivačnej energie na začiatku, čo môžeme odôvodniť oneskorením teploty HYA za panvičkou. Je to spôsobené tým, že procesy odparovania nasledujú bezprostredne za roztopením ľadu, vznikol teplotný gradient a ten spôsobil komplikácie v kinetike na začiatku procesu. Následne ale rýchlo nastupuje rovnováha (vzorka aj panvička majú rovnakú teplotu). Pozorujeme ďalší priebeh zobrazený na grafe (obr.15-16). Pre lepšie vysvetlenie plata boli zmerané aj veľmi nízke koncentrácie vody v HYA jak je znázornené v obrázku 17. Výsledky len potvrdzujú naše úvahy o priebehu odparovania.

Je zrejmé, že experimentálne techniky použité v tejto práci rovnako ako prístupy majú svoje limity a obmedzenia. V malej miere sú výsledky ovplyvnené tiež samotnou transformáciou získaných dát vzhľadom k tomu že každá numerická operácia zanáša chybu do výsledku i keď len minimálnu. Na druhú stranu, použité prístroje vykazujú vysokú reprodukovateľnosť a citlivosť, čo dáva istotu predovšetkým v oblasti experimentálneho prevedenia.

7 ZÁVER

- Boli pripravené vzorky HYA + voda o koncentráciách 600, 300 a 30% vody v HYA.
- DSC a TGA metódy boli použité ku štúdiu procesov odparovania vody z hyaluronanu.
- Izokonverzné metódy s využitím prístupu navrhnutého Ozawom boli využité k výpočtu aktivačných (desorbčných) energií v jednotlivých krokoch odparovania. Zvolená metóda sa ukázala byť citlivá na deje, ktoré prebiehali počas odparovania.
- Boli potvrdené skoršie výsledky týkajúce sa množstva naviazanej vody na HYA.
- Získané závislosti poukázali na komplikovanosť študovaných procesov a naznačovali tvorbu vodíkových mostíkov stabilizujúcich HYA hydrogél.

8 SLOVNÍČEK POJMOV A SKRATIEK

- E_a – aktivačná energia
- TG – termogravimetria
- DSC – diferenčná kompenzačná kalorimetria
- GMO – geneticky modifikované organizmy
- HYA – kyselina hyalurónová
- HDW – high density water – voda s vyššou hustotou
- LDW – low density water – voda s nižšou hustotou
- c_p – tepelná kapacita
- TA – termická analýza
- FWO - Flynn-Wall-Ozawova metóda
- KAS - Kissinger-Akahira-Sunosova metóda
- NMR – nukleárna magnetická rezonancia
- TMDCS – teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria
- OLIGO – oligosacharidy
- VLMW – very low molecular weight – veľmi nízka molekulová hmotnosť
- LMW – low molecular weight – nízka molekulová hmotnosť
- SMW - semi molecular weight – stredná molekulová hmotnosť
- HMW – high molecular weight – vysoká molekulová hmotnosť

9 ZOZNAM ZDROJOV

- [1] MAYER, K, PALMER, JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*. [online]. 1934, vol. 107 [cit. 2009-03-20], s. 629-634.
- [2] KOGAN, G., et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007, vol. 29, s. 17-25.
- [3] LAURENT, TC, FRASER, JR.: Hyaluronan. *The FASEB Journal* [online]. 2006, vol. 6 [cit. 2009-02-15], s. 2397-2404.
Dostupný z WWW: <<http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/6/7/2397>>.
- [4] STERN R.: Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, 2004, vol. 83, no 7, s. 317–325
- [5] HASCALL, Vincent C., LAURENT, Torvard C.. *Hyaluronan Structure and Physical Properties* [online]. 1997 [cit. 2009-01-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [6] LAPČÍK L. Jr., LAPČÍK L., DE SMEDT S., DEMEESTER J., CHABREČEK P.: Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties and Applications. *Chemical reviews*, 1998, vol.8, [cit. 2009-04-12], s. 2664–2683
- [7] SCOTT JE, CUMMINGS C, BRASS A, CHEN Y: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*, 1991, vol. 274, [cit. 2009-04-20], s. 699–705.
- [8] CHAPLIN, M. F.: Roles of water in biological recognition processes, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, Ed. T. P. Begley (John Wiley & Sons)
- [9] CHAPLIN, M. *Water structure and science* [online]. 2009, [cit. 2008-12-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/clusters.html>>.
- [10] CHAPLIN, M. *Water structure and science* [online], 2009 [cit. 2009-12-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/evidnc.html>>
- [11] PASHLEY, R. M., et al. De-gassed water Is a better cleaning agent. *Journal of Physical Chemistry*. 2005, vol. 109, is. 6, s. 1231-1238
- [12] E. R. CAFFARENA a J. R. GRIGERA, On the hydrogen bond structure of water at different densities, *Physica A*.2004, vol. 342, is. 1-2, 34-39

- [13] WOLFE J., BRYANT G., KOSTER K. L.: What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there?, *Cryo-Letters*, 2002, vol. 23, s. 157–166.
- [14] DILLON , S. R., DOUGHERTY, R. C. Raman studies of the solution structure of univalent electrolytes in water. *Journal of Physical Chemistry*. 2002, s. 7647-7650.
- [15] SEDLÁK, M. Large-scale supramolecular structure in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: I. Light scattering characterization. *Journal of Physical Chemistry*. 2006, s. 4329-4338.
- [16] SEDLÁK, M. Large-scale supramolecular structure in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: II. Kinetics of the formation and long-time stability. *Journal of Physical Chemistry*. 2006, s. 4339-4345.
- [17] SEDLÁK, M. Large-scale supramolecular structure in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: III. Correlation with molecular properties and interactions. *Journal of Physical Chemistry*. 2006, s. 13976-13984.
- [18] CHAPLIN, M. [Http://www.lsbu.ac.uk/water/hydrat.html#top](http://www.lsbu.ac.uk/water/hydrat.html#top) [online] 2008, 21.10.2008 [cit. 2009-04-11].
Dostupný z WWW: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/hydrat.html#top>>.
- [19] HAYASHI Y., SHINYASHIKI N. and YAGIHARA S., Dynamical structure of water around biopolymers investigated by microwave dielectric measurements using time domain reflectometry method, *Journal of Non-Crystalline Solids* (2002) 328-332.
- [20] WUNDERLICH B., *Thermal analysis of Polymeric Materials*. Berlin: Springer-Verlag, 2005, ISBN 3-540-23629-5.
- [21] HATAKEYAMA T., QUINN F. X.: *fundamentals and applications to polymer science*, 2 vydání, John Willey & Sons Ltd., 1999, 180 stran, ISBN 0-471-98362-4
- [22] OKULIAR, J., DAUČÍK, P., ŠIMON, P.: Termogravimetria a jej využitie na štúdium materiálov. *Ropa, uhlie, plyn a petrochémia*, 2002, roč. 44, s. 39–42.
- [23] WATSON E. M., O'NEILL M. J., JUSTIN, J., BRENNER, N.: A Differential Scanning Calorimeter for Quantitative Differential Thermal Analysis. *Analytical Chemistry*, 1964, vol. 36, s.1233–1238
- [24] RAMACHANDRAN, V., S., PAROLI, R., M., BEAUDOIN, J., J., DELGADO, A., H.: *Handbook of thermal analysis of construction materials*, New York, 691 stran, ISBN 0-8155-1487-5, 2002
- [25] Le BEOUF, E. J., WEBER, W. J.: Macromolecular characteristic of natural organic matter. 1. Insights from Glass transition and enthalpic relaxation behavior, *Environmental Science & Technology*, 2000, vol. 34, s. 3623-3631

- [26] BURDON, J.: Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic?, *Soil Science*, 2001, vol. 166, č. 11, s. 752-769
- [27] YOUNG, K., D., Le BEOUF, E., J.: Glass transition behavior in a peat humic acid and an aquatic fulvic acid, *Environmental Science & Technology*, 2000, vol. 34, s. 4549-4553
- [28] JOUON, N., et al. Hydration of hyaluronic acid as a function of the counterion type and relative humidity. *Carbohydrate polymer*. 1995, no. 26, s. 69-73.
- [29] BERTHOLD, J., et al. Types of adsorbed water in relation to the ionic groups and their counter-ions for some cellulose derivatives . *Polymer*. 1994, vol. 35, is. 26, s. 5729-5736.
- [30] TAKIGAMI, S., TAKIGAMI, M., PHILLIPS, G. O.: Hydration characteristics of the cross-linked hyaluronan derivative hylan. *Carbohydrate Polymers*. 1993, vol. 22, is. 3, s. 153-160.
- [31] BENEŠOVÁ, K., et al.: STABILITY EVALUATION OF n-ALKYL HYALURONIC ACID DERIVATES BY DSC AND TG MEASUREMENT. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2006, vol. 83, is. 2, s. 341-348.
- [32] CHILD, T.F.: Pulsed n.m.r. study of molecular motion and environment of sorbed water on cellulose . *Polymer*. 1972, vol. 13, is. 6, s. 259-264.
- [33] BERTHOLD, J., et al. Association of water to polar groups; estimations by an adsorption model for ligno-cellulosic materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996, no. 112, s. 119-127.
- [34] KUČERÍK , J., et al. The role of various compounds in humic acids stability studied by TG and DTA . *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2006, vol. 84, no. 3, s. 715-720.
- [35] SANCHEZ, M.E., et al. Thermogravimetric kinetic analysis of the combustion of biowastes . *Renewable Energy*. 2009, vol. 34, is. 6, s. 1622-1627.
- [36] POURMORTAZAVI, S.M., et al. Effect of nitrate content on thermal decomposition of nitrocellulose. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, vol. 162, is. 2-3, s. 1141-1144.
- [37] E.A.G. PINEDA, et al.: Thermal decomposition of enalapril maleate studied by dynamic isoconversional method, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 79 (2005), s. 259–262.
- [38] ŠIMON, P.: The single-step approximation. Attributes, strong and weak sides. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2007, vol. 88, no. 3, s. 709-715.

- [39] ŠIMON, P.: Considerations on the single-step kinetics approximation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2005, vol. 82, no. 3, s. 651–657.
- [40] ŠIMON, P.: Single-step kinetics approximation employing non-Arrhenius temperature functions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2005, vol. 79, no. 3, s. 703–708.
- [41] ŠIMON, P.: Isoconversional methods. Fundamentals, meaning and application. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2004, vol. 76, no- 1, s. 123–132.
- [42] PRŮŠOVÁ, A.: *Hydratace hyaluronové kyseliny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 81 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.